

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 146 552**

⑫ Número de solicitud: 009802465

⑬ Int. Cl.⁷: C07K 14/495

C07K 14/71

A61K 38/18

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: 24.11.1998

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: 01.08.2000

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.08.2000

⑱ Solicitante/s: INSTITUTO CIENTÍFICO Y
TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.
Avda. Pío XII, 53
31008 Pamplona, Navarra, ES

⑲ Inventor/es: Ezquerro Sáenz, Ignacio José;
Lasarte Sagastibelza, Juan José;
Prieto Valtueña, Jesús y
Borrás Cuesta, Francisco

⑳ Agente Elzaburu Márquez, Alberto

㉑ Título: Péptidos inhibidores de TGF β 1.

㉒ Resumen:

Péptidos inhibidores de TGF β 1.
Péptidos sintéticos antagonistas, obtenidos de TGF β 1
o de sus receptores en el organismo, que pueden ser
utilizados en la fabricación tanto por sí solos, como
las secuencias génicas que los codifican y los sistemas
recombinantes que los expresen, en la fabricación de
composiciones útiles para el tratamiento de enfer-
medades hepáticas y más concretamente en casos
de fibrosis. Dichas composiciones pueden incluir op-
cionalmente mimotopos de dichos péptidos activos.

ES 2 146 552 A1

DESCRIPCION

Péptidos inhibidores de TGF β 1.

5 Descripción del estado de la técnica

El control del crecimiento celular está regulado por diferentes proteínas del grupo de los factores de crecimiento (Schalch DS y col (1979) Endocrinology 104:1143-1151). Entre los factores de crecimiento más importantes implicados en el desarrollo celular, capaces de actuar de forma autocrina y paracrina, se encuentran los factores transformantes del crecimiento (TGF, del inglés *Transforming Growth Factor*) (Braun L. y col. (1988) Cell Biol 85:1539-1543; Lyons RM y Moses HL (1990) Eur. J. Biochem. 187:467-473).

El término TGF se utilizó, por primera vez, para describir la actividad producida por una línea celular transformada con el virus del sarcoma murino (deLarco JE y Todaro GJ (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4001-4005; Mizel SB y col. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:2205-2208). El sobrenadante de estas células fue capaz de inducir el normal crecimiento, en agar blando, de células que necesitan un soporte sólido para crecer. Estudios más específicos pusieron en evidencia dos clases de TGP, que se denominaron TGF α y TGF β , que a su vez abarcan a familias de proteínas relacionadas. La familia del TGF β está formada por 5 isoformas (Brand T. y Schneider MD (1995) J. Mol. Cell Cardiol. 27:5-18) de estructura dimérica (Schlunneger MP y Grutter MG (1992) Nature 358:430-434; Brand T. y Schneider MD (1995) J. Mol. Cell Cardiol. 27:5-18). Estudios de las proteínas maduras, purificadas a partir de una misma especie, han demostrado un alto grado de identidad entre sus secuencias (Tabla 1).

Tabla 1. Homología entre los diferentes tipos de TGF β s. TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 procedente de humanos, TGF β 4 procedente de pollo y TGF β 5 procedente de rana. (Roberts AB y Sporn MB. 1990).

% de	TGF β 1	TGF β 2	TGF β 3	TGF β 4	TGF β 5
TGF β 1	100				
TGF β 2	71	100			
TGF β 3	72	76	100		
TGF β 4	82	64	71	100	
TGF β 5	176	66	69	72	100

El TGF β 1 se sintetiza como un precursor de 390 amino-ácidos denominado Pre-Pro-TGF β 1. En una primera hidrólisis se produce la liberación de un fragmento hidrófobo de 29 aminoácidos, que da lugar al Pro-TGF β 1. Posteriormente se libera el TGF β 1 maduro mediante otro corte en una región que precede al extremo amino del TGF β 1 y que consta de dos argininas, dando lugar a una proteína de 112 aminoácidos con un peso molecular de 12 kDa. Para dar lugar a la forma biológicamente activa, dos de estos monómeros se unen entre sí por medio de puentes disulfuro, obteniéndose un dímero de 25 kDa. Las modificaciones de esta estructura provocan la pérdida de la función biológica (Barnard JA y col. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1032:79-87).

Se conoce la existencia de varios dominios dentro de la estructura del TGF β 1, uno de estos dominios se encuentra localizado entre los aminoácidos 40 y 82 y está implicado en la unión del TGF β 1 a sus receptores celulares (Quian SW y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:6290-6294; Burmester JK y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:8628-8632).

55 Receptores del TGF β 1 y otras proteínas de unión

Se han caracterizado cinco tipos de receptores específicos para el TGF β 1 (Cheifetz S y col. (1988) J. Biol. Chem. 263:17225-17228 y López Casillas F. y col. (1991) Cell 67:785-795). Estos receptores tienen distintas afinidades para los diferentes tipos de TGF β 1. Los receptores tipo I, II y III son los más conocidos hasta el momento (revisado en Attisano L y col (1994) Biochim. Biophys. Acta 1222:71-80; Derynck R. (1994) Trends Biochem. Sci. 19:548-553; Yingling y col. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1242:115-136). También se han descrito los receptores de tipo IV (MacKay K. y Danielpour D. (1991) J. Biol. Chem. 266:9907-9911) y de tipo V (Ichijo H. y col. (1991) J. Biol. Chem. 266:22459-22464).

Se ha descrito también que los dominios transmembrana y citoplas-máticos de la endoglina (Cheifetz S y col. (1992) J. Biol. Chem. 267:19027-19030; Bellón T. y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2340-2345; Yamashita y col. (1995) J. Biol. Chem. 269:1995-2001; Zhang H. y col. (1996) J. Immunol. 156:564-573)) tiene alrededor de un 70% de analogía con los receptores de tipo III tanto humano como de rata.

- 5 El RIII sería el encargado de unir el TGF β 1 y presentarlo a RII que a su vez formaría un complejo con RI (Yamashita y col. (1994) J. Biol. Chem. 269:20172-20178) o a complejos en los que varias moléculas de RI se asocian con el RII (Weiss G. y Massagué J. (1996) EMBO J 15:276-289). La interacción RII-RI provocaría la fosforilación de RI y la posterior activación de su serin/treonin quinasa la que fosforilaría a segundos mensajeros como las proteínas MADR2 (Macías-Silva M y col., (1996) Cell 87:1215-1224).

Papel del TGF β 1 en la diferenciación y regeneración hepática

Los efectos producidos son distintos dependiendo del momento del desarrollo y del tipo celular.

- 15 • Aumento de la matriz extracelular, al actuar sobre las células estelares hepáticas (células de Ito), principal fuente de proteínas de la matriz (Mustoe TA y col. (1987) Science 237:1333-1336).
- 20 • Diferenciación de las células epiteliales a hepatocitos (Florini JR y col. (1986) J. Biol. Chem. 261:16509-16513).
- Inhibición del crecimiento celular durante el proceso de regeneración hepática. Este efecto es de gran importancia en el mantenimiento del reposo celular in vivo (Kato Y y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9552-9556).
- 25 • Inhibición de la endocitosis del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGF) como se ha podido observar en cultivos de hepatocitos fetales de rata (Noda M. y Rodan GA (1987) J. Cell Physiol. 133:426-437).

Papel del TGF β 1 en la fibrosis hepática

- El TGF β 1 se ha visto asociado a los procesos de fibrosis hepática (Czaja MJ y col. (1989) J. Cell Biol. 108:2477-2482; Annoni G. y col. (1992) J. Hepatol 14:259-264) provocando un aumento de la producción de las proteínas de la matriz extracelular, por las células estelares hepáticas (lipocitos o células de Ito), de sus receptores e inhibiendo la síntesis de las enzimas proteolíticas que degradan la matriz (Ignotz RA y Massagué J. (1986) J. Biol. Chem. 261:4337-4345). En el hígado el TGF β 1 induce la síntesis de colágeno y fibronectina en las células estelares hepáticas (Weiner FR (1990) Hepatology 11:111-117). También existe una autorregulación aumentando su propia síntesis, mediante la inducción de su ARNm.

- 40 El TGF β 1 también se ve implicado en el aumento de la síntesis de la α 2-Macroglobulina sintetizada por los hepatocitos y las células estelares hepáticas activadas. Mediante la unión al TGF β 1 y provocando su inactivación (Bachem MG (1994) Ann NY Acad. Sci. 737:421-424) la α 2-Macroglobulina eliminaría el TGF β 1 de los compartimentos extracelulares.

- 45 El estudio de pacientes afectados por un daño hepático crónico ha mostrado que existe una correlación entre la expresión del TGF β 1 y la expresión del ARNm para el pro-colágeno tipo I y los niveles séricos de péptido tipo III del procolágeno (Castilla A. y col. (1991) N. Engl. J. Med. 324:933-940).

- Los pacientes con cirrosis hepática tienen una expectativa de vida más corta de lo normal debido a las complicaciones que aparecen en el curso de la enfermedad, como la hipertensión portal o la insuficiencia hepática.

Efecto del TGF β 1 sobre la matriz extracelular

- 55 La interacción del TGF β 1 con los receptores celulares provoca:

- Activación de la síntesis de procolágeno, fibronectina (Ignotz RA y col. (1987) J. Biol. Chem. 262:6443-6446) y proteínas relacionadas, entre las que encontramos proteínas de membrana capaces de interactuar con los componentes de la matriz extracelular (Carter WG (1982) J. Biol. Chem. 257:13805-13815).
- 60 • Inhibición de la síntesis de enzimas proteolíticas capaces de degradar la matriz (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282).

• Estimulación de la síntesis de inhibidores de enzimas proteolíticas (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282).

5 Todo esto induce un aumento de las interacciones de la célula con la matriz extracelular, que junto a la mayor reorganización de las proteínas que la componen, da lugar a un aumento en la cantidad total de matriz extracelular (Roberts CJ y col. (1988) J. Biol. Chem. 263:4586-4592). Estas evidencias confirman la implicación del TGF β 1 en procesos de cicatrización (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282; Barnard JA y col. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1032:79-87).

10 *Péptidos como inhibidores de la interacción ligando receptor*

Existe la posibilidad de utilizar pequeñas moléculas, péptidos sintéticos, como análogos de moléculas existentes en el organismo, con el fin de emular su función. Estudios realizados por LeSateur y col demuestran la posibilidad de usar análogos ciclados del factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *Nerve Growth Factor*), emulando la región de giro β , permitiendo su unión al receptor (LeSateur L. y col. (1996) Nature Biotechnology 14:1120-1122). También es posible utilizar péptidos como antagonistas de estas moléculas, evitando que el factor nativo interactúe con su receptor por un bloqueo mediado por el péptido (Lasarte JJ y col. (1994) J. Acquired Immune Deficiency Syndromes 7:129-134; LeSateur y col. (1995) J. Biol. Chem. 270:6564-6569). Estudios anteriores han demostrado la utilidad de los péptidos sintéticos como inhibidores de la interacción ligando-receptor incluso en el caso de que el epitopo de reconocimiento no sea continuo (Daniels AJ y col. (1995) Mol. Pharmacol. 48:425-432). Otros estudios realizados con el receptor tipo II del TGF β 1 y con la fetuina, una glicoproteína del grupo de receptores tipo II, han demostrado la posibilidad de usar péptidos ciclados como inhibidores de la interacción del TGF β 1 con el RII (Demetriou M. y col. (1996) J. Biol. Chem. 271:12755-12761). Con esta ciclación se consigue obtener péptidos con una estructura similar a la que se podría dar in vivo.

Descripción detallada de la invención

30 Por las razones indicadas más arriba, pensamos que péptidos procedentes tanto del TGF β 1 como de sus receptores, o de proteínas con capacidad de unión al TGF β 1, podrían ser inhibidores de la acción del TGF β 1. Por lo que decidimos explorar esta posibilidad.

Elección de los péptidos a sintetizar

35 La elección de los péptidos a sintetizar se realizó de diferente manera según provinieran del TGF β 1 o de sus receptores.

En el caso de la secuencia del TGF β 1 se sintetizaron péptidos de 15 aminoácidos que abarcaron toda la secuencia del TGF β 1. Cada péptido tenía 10 aminoácidos en común con sus dos vecinos inmediatos.

45 En el caso de las secuencias de sus receptores, los péptidos se eligieron en base a programas informáticos diseñados en nuestro laboratorio. Uno de estos programas permite comparar dos secuencias aminoácidas entre sí, con el fin de predecir zonas parcialmente complementarias. También se utilizaron otros programas capaces de predecir las zonas de las proteínas que se encontrarían más expuestas, en base a la hidrofobicidad e hidrofiliidad de los aminoácidos que componen su secuencia.

Síntesis de péptidos

50 Los péptidos se sintetizaron mediante el método de fase sólida (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-54), utilizando fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) como grupo protector temporal del grupo alfa-amino (Atherton et al. (1989) Journal of Chemical Society Perkins Transactions 1: 538-546.). Para la síntesis de pequeñas cantidades de un gran número de péptidos se utilizó un sintetizador múltiple que permite la síntesis simultánea de 96 péptidos (Borrás-Cuesta et al. (1991) Biologicals 19: 187-190). Los péptidos se conservaron a -80°C al estado sólido hasta su utilización.

Purificación de los péptidos por HPLC

60 Los péptidos sintetizados se analizaron y purificaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando un sistema Waters 600E-900 (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos).

Para el análisis de los péptidos, por HPLC analítico, se utilizó una columna Waters Radial-Pak™ C₁₈ 300 Å 15 µm, 8x100mm (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos). El péptido se disolvió en una solución de TFA 0,1% en agua destilada, a una concentración máxima de 1 mg/ml. La solución de péptido se inyectó (100 µl) en la columna y se eluyó en un gradiente de agua/acetonitrilo (Figura 15) (Romil Ltd., Cambridge, Estados Unidos) ambos con 0,1% TFA a un flujo de 1 ml/minuto. Las fracciones que contenían el péptido se detectaron por su absorbancia a 220 nm y 280 nm (photo diode array detector, waters 991, Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos).

Para su purificación se utilizó una columna Waters Delta-Pak™ C₁₈ 300 Å 15 µm, 25x100mm (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos). El péptido se disolvió y se inyectó (2 ml) en las mismas condiciones que en el caso anterior, utilizándose el mismo gradiente a un flujo de 5 ml/min. La fracción que contenía el péptido puro se recogió en un matraz.

Experimentación in vitro. Estudio de la actividad de los péptidos

Líneas celulares

Se utilizó una línea procedente de epitelio de pulmón de visón, MV-1-Lu (CCL-64, American Type Cell Culture, Virginia, Estados Unidos). Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 162 cm² (Costar Corporation, Cambridge, Estados Unidos) en una estufa a 37°C y 5% de CO₂, hasta alcanzar la subconfluencia. Se utilizó un medio completo: RPMI 1640 con L-glutamina (GibcoBRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Escocia) suplementado con un 5% de suero de ternera fetal (FCS, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), HEPES 10 mM (HEPES Buffer 1M, Bio-Whittaker, Verriers, Bélgica) y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomycin 100 µg/ml).

Ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular MV-1-Lu

Las células MV-1-Lu crecidas tal y como se indica más arriba, se despegaron del fondo de los frascos de cultivo utilizando 5 ml de tripsina-EDTA (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), se resuspendieron en medio completo y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 8 minutos. Tras la centrifugación las células se resuspendieron en medio completo a una concentración de 50000 células/ml. Para la realización del ensayo se tomaron 10 ml de la suspensión de células y se dispensaron a placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar Corporation, Cambridge, Estados Unidos) añadiendo 100 µl/pocillo, y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂, lo que permite la adhesión de las células al fondo de los pocillos. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron los péptidos a ensayar en RPMI, a una concentración final de 200 µg/ml en presencia de una concentración de 200 pg/ml de TGFβ₁ en RPMI (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido). La concentración final de FCS en el pocillo fue del 2,5%. Tras 24 horas de incubación se añadió 1 µCi de timidina tritiada por pocillo ([methyl-³H]-timidine 25 Ci/mmol, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) y se incubó durante 12 horas adicionales (Grubeck-Loebenstein B. y col. (1989) J. Clin. Invest. 83:764-770; Brennan FM y col. (1990) Clin. Exp. Immunol. 81:278-285).

Una vez terminados los periodos de incubación las células se despegaron del fondo de los pocillos con tripsina-EDTA y se recogieron utilizando un recolector manual (Titertek cell harvester, Skatron Instruments Inc., Sterling, Estados Unidos) que lisa las células recogiendo el ADN en filtros de nitrocelulosa (Filter MAT 11731, Skatron Instruments Inc., Sterling, Estados Unidos) donde queda fijado. Los filtros se colocaron individualmente en tubos de polipropileno de 5 ml a los que se añadió 4 ml de líquido de centelleo (Biogreen-11, Reactivos Scharlau S.A., Barcelona, España). La actividad de cada tubo se cuantificó durante 90 segundos en un contador de centelleo β LKB (Beta plate system, LKB, Uppsala, Suiza).

Estudio de la inhibición de la unión del TGFβ₁ a los receptores celulares

Marcaje selectivo de los receptores celulares (Affinity labeling)

Las células MV-1-Lu se despegaron de los frascos de cultivo incubándolas a 37°C durante 10 minutos, con 10 ml de la solución 1 (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonato 25 mM a pH 7,5, glucosa 5 mM y EDTA 1 mM). Las células así despegadas se resuspendieron en la solución 2 (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonato 50 mM a pH 7,5, CaCl₂ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM y 5 mg/ml BSA) y se recogieron por centrifugación a 1000 x g. durante 5 minutos. Tras la centrifugación las células se resuspendieron en la solución 2 a una concentración de 10⁶ células/ml.

A partir de esta suspensión celular se hicieron alícuotas de 0,5 ml en placas de 24 pocillos (Greiner GmbH, Frickenhausen, Alemania) donde se añadieron los péptidos, en 50 µl de una solución 0,8 mg/ml,

se incubaron durante 2 horas a 4°C en agitación. Posteriormente se añadió ^{125}I -TGF β 1 (2 μCi) a una concentración final de 277,2 pM (^{125}I -TGF β 1 human recombinant 800-2200Ci/mmol, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) y se incubó durante otras dos horas a 4°C en agitación.

Tras la incubación las células se transfirieron a un tubo de centrifuga donde se centrifugaron en frío a 12000 x g. durante 1 minuto. Posteriormente se lavaron 2 veces en solución 2 fría y se resuspendieron en 0,5 ml de solución 2 fría, 5 μl de dimetil sulfoxido (DMSO 99,5 %, Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) y disuccimidil suberato (DSS, Pierce Chemical Co., Rockford, Estados Unidos) dando una concentración final 0,25 mM de DSS. La reacción se detuvo a los 15 minutos por dilución, centrifugación y lavado con una solución que contiene sacarosa 0,25M, Tris 10 mM y EDTA 1 mM a pH 7,4. El precipitado de células se resuspendió en 0,5 ml de Tritón x-100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) 1 % v/v, Tris 10 mM a pH 7,0, EDTA 1 mM, Fenilmetilsulfonil fluoruro 0,1mM, Pepsatin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y Leupeptin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) y se incubó durante 40 minutos a 4°C. La fracción insoluble en detergente se separa por centrifugación a 12000 x g. durante 15 minutos. Las fracciones solubles en detergente (sobrenadante) e insoluble (precipitado) se congelaron a -20°C (Massagué J. y Like B. (1985) J. Biol. Chem. 260:2636-2645).

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato-sódico

Las fracciones soluble e insoluble en detergente se utilizaron para análisis electroforéticos en geles de acrilamida/bisacrilamida al 7.5 % durante 5-6 horas a 220 voltios.

La tinción de las proteínas se realizó con una solución de comassie brilliant blue® R250 (Serra Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Alemania) en metanol 50 %, ácido acético 10 % y agua destilada, durante 30 minutos. Los lavados posteriores se realizaron con una solución de metanol 50 %, ácido acético 10 % y agua destilada durante 15 minutos, en un primer lavado y metanol 2.5 %, ácido acético 0.5 % y agua destilada, en los siguientes lavados, hasta la eliminación del color de fondo.

Citometría de flujo

La inhibición de la unión del TGF β 1, mediada por los péptidos, a los receptores celulares se midió mediante el método de inmunofluorescencia directa. Para ello se utilizó un Kit de inmunofluorescencia (Fluorokine rh TGF β -biotin, R&D Systems Europe Ltd., Abingdon Reino Unido). Este ensayo está basado en la capacidad de unión del TGF β 1 biotinilado a los receptores celulares, de forma específica y la posterior interacción de la biotina con avidina fluoresceinada; de tal forma que la intensidad de la señal dependerá de la cantidad de TGF β 1 unido a los receptores celulares.

Las células MV-1-Lu crecidas en frascos de 162 cm² se despegaron utilizando la solución 1 (descrita anteriormente) y se resuspendieron en suero fisiológico para su centrifugación a 500 x g. durante 5 minutos. Tras la centrifugación las células se resuspendieron de nuevo en suero fisiológico a una concentración de 4x10⁶ células/ml. Se añadieron 25 μl de la suspensión celular a tubos de borosilicato de 12x75 mm a los que se añadió el péptido a ensayar en 40 μl de medio RPMI 1640, dando una concentración final de 0,42 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 10 μl de TGF β 1 biotinilado. Como control de la especificidad se añadió 10 μl de un reactivo biotinilado suministrado por el Kit, como control positivo se añadió 10 μl de TGF β 1 biotinilado y como control negativo se añadió 20 μl de un anticuerpo bloqueante anti-TGF β 1. En todos los controles se añadió suero fisiológico hasta alcanzar un volumen total de 75 μl . Todos los tubos se incubaron durante una hora a 4°C en oscuridad.

Transcurrido el periodo de incubación se añadió 10 μl de avidina fluoresceinada y se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, tras los que se añadió 2 ml de una solución de lavado (RDF1) y se centrifugó a 500 x g durante 6 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 0,2 ml de PBS frío para el análisis citométrico (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California, Estados Unidos). Este procedimiento permite medir la fluorescencia emitida por cada célula al incidir sobre ella un haz de láser mediante un programa informático (LisysTM II, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California, Estados Unidos). En la Figura 16 se muestra una imagen típica del análisis por citometría de flujo.

Para la obtención de los datos de inhibición de la unión del TGF β 1 a los receptores se utilizó el control positivo del ensayo para delimitar los campos correspondientes a las células marcadas, que han unido al TGF β 1-biotina, (M2) y a las células no marcadas (M1). Una vez delimitados los campos se calculó el porcentaje de células que se encontraba dentro de cada uno. Se hizo lo mismo con los datos obtenidos cuando se incubaba el péptido con TGF β 1-biotina o con las células, según fueran procedentes de los receptores o del TGF β 1 respectivamente. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de cada péptido utilizando la siguiente fórmula: $100 - ((\text{M2 Péptido} - \text{M2 Negativo}) \times 100 / (\text{M2 Positivo} - \text{M2 Negativo}))$.

Experimentación in vivo. Modelo de fibrosis experimental

Se utilizaron ratas blancas macho (raza Wistar albina), procedentes de camadas simultáneas (5 semanas \pm 1,5 semanas), con el fin de obtener un grupo homogéneo en edad, y peso inicial. A lo largo del periodo de experimentación, los animales fueron mantenidos en condiciones de temperatura constante (22°C) y con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Tuvieron libre acceso al agua y a la comida.

Se indujo cirrosis hepática (CH) mediante inhalación de tetracloruro de carbono, durante 11 semanas, dos veces por semana (López Novoa JM y col (1976) Patología IX:223-240; Camps J. y col. (1987) Gastroenterology 93:498-505). La exposición al CCl₄ se efectuó haciendo burbujear aire comprimido, a un flujo de 3 litros/minuto, a través de un frasco lavador de gases. Se comenzó con un minuto de exposición, aumentando en un minuto por semana hasta llegar a 4 minutos en la cuarta semana. Durante la quinta semana no se administró CCl₄, comenzando de nuevo a la sexta semana con una exposición de 5 minutos. Este tiempo de exposición se mantuvo hasta la semana 11. En el agua de bebida se añadió 400 mg/l de fenobarbital (*Luminal®*, Bayer, Leverkusen, Alemania), desde una semana antes de iniciar la exposición al CCl₄ y hasta el final del periodo de experimentación. Antes de iniciar el tratamiento se dejó una semana, en la que no se les administró CCl₄. Durante el tratamiento se les administró una dosis semanal de CCl₄, como recuerdo (Figura 2).

20 *Distribución de los animales*

Los animales se distribuyeron en 4 grupos antes de iniciarse el proceso de inducción de la cirrosis hepática. *Controles Sanos (Co)*: Animales que no fueron sometidos al proceso de fibrosis.

25 *Controles Sanos tratados (Co+P144)*: Animales que no fueron sometidos al proceso de fibrosis y se les administró el péptido P144 durante las 3 últimas semanas (coincidiendo en el tiempo con el tratamiento del grupo de ratas Tto₂).

30 *Controles Cirróticos 1 (Ci₁)*: Animales sometidos al proceso de inducción de cirrosis por inhalación de CCl₄ dos veces por semana. Estos animales se separaron en 2 grupos al llegar a la quinta semana:

Controles Cirróticos 1 (Ci₁): Animales que siguieron sometidos al proceso de inducción de la fibrosis hasta la semana 11, sin administrarles el péptido P144. Se les administró suero salino en días alternos, durante todo el proceso de inducción (semanas 5 a 11).

35 *Cirróticos Tratados 1 (Tto₁)*: Animales a los que se le administró el péptido P144 procedente de la secuencia del receptor tipo III, en días alternos, durante el proceso de inducción de la fibrosis, desde la semana 5 hasta la semana 11.

40 *Controles Cirróticos 2 (Ci₂)*: Animales que siguieron sometidos al proceso de inducción de la fibrosis sin recibir el péptido P144 ni suero salino. Este grupo se subdividió en otros dos al llegar a la semana 11.

Controles Cirróticos 2 (Ci₂): Animales cirróticos que no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento, manteniéndose como controles. Estos animales recibieron inyecciones de suero salino durante 3 semanas (semanas 13 a 15).

45 *Cirróticos Tratados 2 (Tto₂)*: Animales cirróticos que fueron tratados con el péptido procedente de la secuencia del receptor tipo III (P144), durante 3 semanas (semanas 13 a 15).

Tratamiento de los animales

50 • *Grupo Tto₁*: Estos animales fueron sometidos a tratamiento durante el proceso de fibrosis. El tratamiento con el péptido se inició en la quinta semana, (antes de la exposición al CCl₄ durante 5 minutos) y se continuó hasta finalizar las once semanas del proceso de inducción de cirrosis.

55 • *Grupo Tto₂*: Estos animales fueron sometidos a tratamiento después de finalizado el proceso de inducción de cirrosis (11 semanas). El tratamiento se inició una semana después de la última inhalación de CCl₄ y se continuó durante 21 días.

60 Antes de iniciar el tratamiento y al finalizarlo se extrajo sangre a todos los animales sometidos al tratamiento con el péptido. El péptido fue administrado por inyección subcutánea, en la zona abdominal a una dosis de 70 µg/animal en 500 µl de suero fisiológico.

Sacrificio de los animales y disección del hígado

Finalizado el tratamiento de los animales con el péptido, tanto en el modelo con ratas como en el de ratones, se sacrificaron por decapitación, después de haberles extraído sangre del plexo retrorbital con un capilar.

Inmediatamente después se procedió a la disección del hígado y la recogida de muestras.

Se cortaron las muestras y se introdujeron en formol como solución fijadora, para su posterior análisis histológico. Otros fragmentos se introdujeron en criotubos, que tras la inmersión en nitrógeno líquido se conservaron a -80°C .

Evaluación anatomopatológica del hígado

El estudio histológico se realizó en fragmentos de hígado previamente fijados en formol durante al menos 24 horas, transcurridas las cuales se introdujeron en etanol (70%).

Tras la deshidratación se procedió a la inclusión en bloques de parafina. De los bloques obtenidos se realizaron cortes seriados de $3\text{ }\mu\text{m}$ de espesor, empleando un microtomo de rotación Leitz y cuchillas de acero. Previamente a la tinción los cortes se desparafinaron en xilol (AnalaR, BDH, Poole, Reino Unido) durante 15 minutos, después de calentarlos a 60°C en una estufa, durante 15 minutos, y se hidrataron mediante pasos sucesivos por alcoholes de concentración decreciente 100%, 96%, 80% y 70% finalizando en agua. Se realizaron las siguientes tinciones:

Hematoxilina-Eosina.

Tricrómico de Masson (Locquin M. y Langeron, (1985) en Manual de Microscopía Ed. Labor S.A Barcelona): Utiliza un colorante específico para proteínas colagénicas (verde luz).

Rojo Sirio: Tinción específica para colágeno.

Confirmación de la fibrosis hepática: análisis de imagen

Para el análisis de imagen de las muestras obtenidas se utilizó un microscopio de luz (Olympus BH-2, Tokio, Japón) conectado a una cámara de vídeo (Sony DXP-950P, Sony Co., Tokio, Japón), con la que se captaron los diferentes campos de cada preparación. Se tomaron 6 campos de manera aleatoria a partir de cada preparación teñida con rojo sirio. Las diferentes imágenes captadas se analizaron por medio de un programa informático (Visilog 4.1.5, Nocsis, Orsay, Francia) capaz de calcular el área de fibrosis y el área total de la preparación. Con estos datos se calculó un índice de fibrosis (área de fibrosis/área total) de cada campo. Para poder utilizar este programa se necesitó modificar la adquisición de las imágenes mediante la utilización de filtros de luz polarizada (Olympus U-POT, Tokio, Japón) y de luz verde (Olympus IF550, Tokio, Japón) lo que permitió la automatización del proceso de análisis de las muestras.

Detección de colágeno en cortes de $14\text{ }\mu\text{m}$ de tejido parafinado

Los cortes de $14\text{ }\mu\text{m}$ que se utilizaron para esta técnica se obtuvieron de la misma manera que los cortes de $3\text{ }\mu\text{m}$ anteriormente mencionados. Estos cortes fueron sometidos a un proceso de desparafinización durante 12 horas en xilol. Una vez eliminada la parafina, las muestras fueron hidratadas pasándolas por diferentes grados de alcohol 96%, 80%, 50%, finalizando el proceso en agua destilada.

Una vez hidratadas se sometieron a un proceso de pretinción en una solución de 160 mg de Fast Green FCF (Fluka chemika-BioChemika, Buchs, Suiza) en 160 ml de ácido pícrico (Merk, Darmstadt, Alemania) saturado durante 15 minutos en oscuridad. Las muestras se lavaron por inmersión en agua hasta que dejaron de colorear el agua de lavado. Una vez eliminado el colorante sobrante, las muestras se tiñeron durante 30 minutos en oscuridad en una solución de 160 mg de Direct Red 80, (Fluka Chemika-BioChemika Buchs, Suiza) y 64 mg de Fast Green, ambos colorantes en 160 ml de ácido pícrico saturado. Se lavaron de nuevo hasta eliminar el colorante sobrante y se procedió a despegar las muestras de los portales mediante el raspado de la muestra con una espátula pequeña. Los cortes así despegados se introdujeron en diferentes tubos que contenían 3 ml de una solución de NaOH 0,1 N (Quimón, Montplet & Esteban S.A., Barcelona, España) y Metanol (1:1). Se tomaron alícuotas de los diferentes tubos para su lectura en el espectrofotómetro (Lambda 2 UV/VIS spectrophotometer, Perkin-Elmer, Norwalk, Estados Unidos) a longitudes de onda de 540 nm y 630 nm utilizándose como blanco una alícuota de la solución de NaOH

0,1 N y Metanol (López de León A. y Rojkind (1985) *Histochem Cytochem* 33:737-743; Gaudio E. y col. (1993) *Int. J. Exp. Path.* 74:463-469).

De acuerdo a los trabajos de Gaudio E. y col. (1993) *Int. J. Exp. Path.* 74:463-469) se utilizaron las siguientes fórmulas para la obtención de las cantidades de colágeno y de proteína total:

$$\text{mg Colágeno} = \frac{\text{absorbancia a 540 nm} - \text{absorbancia a 630 nm}}{37}$$

$$\text{mg Colágeno/mg proteína total} = \frac{\text{mg Colágeno}}{\text{mg Colágeno} + \text{mg proteínas no colagénicas}}$$

$$\text{Proteínas no colagénicas} = \frac{\text{absorbancia a 630 nm}}{3}$$

Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos obtenidos en la experimentación *in vivo* se sometieron a análisis estadístico. La normalidad de las variables cuantitativas se comprobó mediante el ensayo de Shapiro-Wilks.

Debido a que los datos no se ajustaban a una distribución normal se realizó estadística no paramétrica. La comparación entre grupos se hizo mediante la H de Kruskal-Wallis seguida de la comparación de U de Mann-Whitney. Los datos se graficaron mediante cajas representándose la mediana de los datos, línea gruesa dentro de cada caja, junto con el rango intercuartílico, altura de la caja, mientras que los bigotes de cada caja representan las observaciones más altas y más bajas dentro de un determinado rango intercuartílico.

La asociación entre variables se estudió mediante la prueba exacta de Fisher. Se realizó una regresión logística para estudiar la independencia de la asociación de estas variables.

Se consideró significativo el valor de P igual o menor de 0.05.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS para Windows V 6.1.3.

Inhibición *in vitro* de la actividad del TGF β 1

Ensayo de inhibición del crecimiento celular de la línea MV-1-Lu

El TGF β 1 es una citoquina capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de la línea celular MV-1-Lu (Grubeck-Loebenstein B. y col. (1989) *J. Clin. Invest.* 83:764-770; Brennan FM y col. (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81:278-285), por lo que esta línea se utilizó para ensayar el efecto bloqueante de los péptidos sobre el TGF β 1. Tras diferentes combinaciones de medios, células y timidina se estudió el efecto de distintas concentraciones de TGF β 1 sobre la incorporación de [metil- ^3H] timidina, por parte de las células MV-1-Lu en cultivo, hasta determinar las condiciones más adecuadas para el ensayo. Estas condiciones se muestran en la Figura 3.

Una vez determinadas tanto la concentración óptima de células MV-1-Lu (5000 células/pocillo) como la menor concentración de TGF β 1 capaz de producir una inhibición de alrededor del 90% (200 pg/ml, Figura 18) se ensayó el efecto inhibitorio de los péptidos sintéticos a la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$.

Inhibición *in vitro* de la actividad del TGF β 1 mediante péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos potencialmente inhibidores de la actividad del TGF β 1, elegidos tal como se indica más arriba en la sección: elección de los péptidos a sintetizar (tanto los procedentes de proteínas que se unen al TGF β 1 como del propio TGF β 1) se ensayaron utilizando la línea celular MV-1-Lu. Los péptidos se disolvieron en medio RPMI tamponado, libre de suero de ternera fetal y se procedió como sigue:

Los péptidos pertenecientes a la secuencia del receptor, o complementarios a los picos de hidrofiliidad del TGF β 1, se incubaron durante 30 minutos en presencia de esta citoquina y luego se agregaron al cultivo celular. Los péptidos procedentes de la secuencia del TGF β 1 se añadieron al cultivo celular antes de la adición del TGF β 1, para que interaccionaran con los receptores de la superficie celular. Estas incubaciones se realizaron en 100 μl del mismo medio que el utilizado para añadir las células. Los péptidos activos permitieron el crecimiento celular en mayor o menor grado según fuera su capacidad de inhibir al TGF β 1.

Inhibición del TGF β 1 mediante péptidos procedentes del TGF β 1

En una primera etapa se sintetizaron péptidos solapados procedentes del TGF β 1. Estos péptidos
 5 (Tabla 2) se sintetizaron pensando que alguno de ellos podría unirse a los receptores celulares, impidiendo de esta manera la unión del TGF β 1 natural a estos receptores.

Tabla 2. Péptidos procedentes del TGF β 1. Se indica el número del péptido junto a su
 10 posición en la secuencia completa, así como su secuencia de aminoácidos. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

	<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>
15	P1 (280-293)	AlaLeuAspThrAsnTyrCysPheSerSerThrGluLysAsn
	P2 (284-297)	AsnTyrCysSerSerThrGluLysAsnCysCysValArg
	P3 (288-301)	SerSerThrGluLysAsnCysCysValArgGlnLeuTyrIle
20	P4 (294-307)	CysCysValArgGlnLeuTyrIleAspPheArgLysAspLeu
	P5 (298-311)	GlnLeuTyrIleAspPheArgLysAspLeuGlyTrpLysTrp
	P6 (302-315)	AspPheArgLysAspLeuGlyTrpLysTrpIleHisGluPro
	P7 (306-319)	AspLeuGlyTrpLysTrpIleHisGluProLysGlyTyrHis
25	P8 (308-321)	GlyTrpLysTrpIleHisGluProLysGlyTyrHisAlaAsn
	P9 (312-325)	IleHisGluProLysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGly
	P10 (316-329)	LysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyr
	P11 (319-333)	HisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeu
	P12 (322-335)	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThr
30	P13 (326-339)	ProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThrGlnTyrSerLys
	P14 (330-343)	IleTrpSerLeuAspThrGlnTyrSerLysValLeuAlaLeu
	P15 (335-349)	ThrGlnTyrSerLysValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnPro
	P16 (336-349)	GlnTyrSerLysValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnPro
35	P17 (340-353)	ValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAla
	P18 (343-358)	LeuTyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCys
	P19 (344-358)	TyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCys
	P20 (348-360)	AsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCysValProGln
40	P21 (350-363)	GlyAlaSerAlaAlaProCysCysValProGlnAlaLeuGlu
	P22 (354-367)	AlaProCysCysValProGlnAlaLeuGluProLeuProIle
	P23 (358-371)	ValProGlnAlaLeuGluProLeuProIleValTyrTyrVal
	P24 (364-377)	ProLeuProIleValTyrTyrValGlyArgLysProLysVal
45	P25 (368-381)	ValTyrTyrValGlyArgLysProLysValGluGlnLeuSer
	P26 (372-385)	GlyArgLysProLysValGluGlnLeuSerAsnMetIleVal
	P27 (379-391)	GluGlnLeuSerAsnMetIleValArgSerCysLysCysSer

En la Figura 4 se muestra el efecto inhibitorio de los péptidos de la Tabla 6 sobre la actividad del
 50 TGF β 1. Puesto que el TGF β 1 inhibe el crecimiento de las células MV-1-Lu, la inhibición de esta citoquina mediante los péptidos conlleva el restablecimiento del crecimiento de las células MV-1-Lu.

Como se puede observar en la Figura 4 el péptido P12, procedente de la secuencia del TGF β 1, es
 55 el que presenta una mayor actividad inhibitoria del TGF β 1. Con el fin de estudiar con más detalle el efecto inhibitorio del péptido P12 se realizó un estudio del efecto de la concentración del péptido sobre la inhibición de la citoquina, el cual se indica a continuación.

Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGF β 1 por el péptido P12

Se estudió el efecto de la concentración del péptido P12 sobre la inhibición de la actividad del TGF β 1.
 60 Debido a que este péptido no fue fácilmente soluble en el medio de ensayo, se prepararon soluciones o suspensiones madre de concentración nominal de péptido (aquella que se hubiera logrado si el péptido se

hubiera disuelto completamente) y a partir de ellas se tomaron alícuotas que se filtraron o bien se usaron directamente para los ensayos de inhibición.

En la Figura 5 se estudia el efecto inhibitor de concentraciones nominales de péptido, antes y después de filtrar. Se observa que el péptido P12 filtrado y sin filtrar tiene prácticamente la misma actividad.

Una vez obtenidos los resultados con el péptido P12 se decidió alargar el péptido tanto, en el sentido N-terminal como C-terminal y estudiar el efecto sobre su actividad. Además se hicieron modificaciones en su secuencia para mejorar su solubilidad y estudiar la importancia de las dos Cisteínas de su secuencia sobre la actividad inhibitoria del TGF β 1. Los péptidos sintetizados se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Péptidos procedentes de la modificación del péptido P12.

Péptido	Secuencia
P12 ₍₃₂₂₋₃₃₅₎	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThr
P28 ₍₃₂₂₋₃₄₄₎	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThrGlnLysVal LeuAlaLeuTyr
P29 ₍₃₁₃₋₃₃₅₎	HisGluProLysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyr IleTrpSerLeuAspThr
P30	PheSerLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThr
P31	PheCysLeuGlyProSerProTyrIleTrpSerLeuAspThr
P32	PheSerLeuGlyProSerProTyrIleTrpSerLeuAspThr
P33	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerAspAspAsp
P34	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThr
P35	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrpSerAspAspAsp
P36	GlyProCysProTyrIleTrpSerAspAspAsp
P37	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrpSer
P38	AspGlyProCysProTyrIleTrpSerAsp

En la Figura 6 se muestran los resultados de la inhibición del TGF β 1 por parte de los péptidos de la Tabla 3.

En la Figura 6 se observa que el péptido P29 es activo. Este péptido engloba al péptido P12 probado anteriormente y tiene 9 aminoácidos mas hacia el extremo N-terminal (Figura 4). Estudios realizados por Quian SW y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:6290-6294) y por Burmester JK y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:8628-8632) mediante la utilización de proteínas quiméricas recombinantes identificaron una región del TGF β 1 necesaria para la actividad de esta citoquina (aminoácidos 40 a 82, en la secuencia del TGF β 1 maduro). Se especuló que el péptido P29 (aminoácidos 34 a 56, en la secuencia del TGF β 1 maduro) al abarcar una zona mayor que el péptido P12 (aminoácidos 43 a 56), podría adquirir una estructura tridimensional más semejante a la estructura del TGF β 1 en circulación. Por este motivo se utilizó el péptido P29 para ensayos de unión a los receptores celulares, basados en el marcaje por afinidad.

Ensayos de inhibición de la unión del TGF β 1 a sus receptores por el péptido P29 (marcaje por afinidad)

El péptido P29 procedente de la secuencia del TGF β 1, se utilizó en los ensayos de marcaje por afinidad para comprobar su capacidad de inhibición de la unión del TGF β 1 a sus receptores celulares (Material y Métodos).

Debido a la diferente actividad de los lotes de ^{125}I -TGF β 1 empleados, las concentraciones de péptido utilizadas en los ensayos se ajustaron en función de la concentración del lote ^{125}I -TGF β 1 utilizado en cada caso. Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 7 y 8.

Se realizaron ensayos posteriores para buscar la concentración mínima necesaria para bloquear la unión del ^{125}I -TGF β 1 a los receptores celulares.

Inhibición del TGF β 1 mediante péptidos procedentes de la secuencia del receptor de tipo III de rata

Con el propósito de encontrar nuevos péptidos inhibidores de la actividad del TGF β 1 se sintetizaron péptidos procedentes del receptor tipo III de rata. Algunos péptidos se eligieron en base a zonas de su secuencia que fueron predichas como complementarias a bloques de aminoácidos de la secuencia del TGF β 1. Se esperaba que estos péptidos fueran capaces de unirse al TGF β 1 libre, secuestrándolo e impidiendo su unión a los receptores celulares.

Otros péptidos se sintetizaron solapando 10 aminoácidos y cubriendo parte de la zona extracelular del receptor de tipo III (aminoácidos 45 a 410). Se ha descrito que existe un receptor tipo III soluble que se corresponde con la zona extracelular del receptor, esta zona se corta de la membrana y actúa como un secuestrador del TGF β 1 en circulación (López Casillas F. y col. (1991) Cell 67:785-795). Estudios posteriores han descrito dos posibles zonas de unión al TGF β 1, una de ellas se encuentra en el extremo N-terminal del receptor (López-Casillas y col. (1994) J. Cell Biol. 124:557-568) y la otra se encuentra en la zona más próxima a la membrana, hacia el extremo C-terminal (Fukushima D. y col. (1993) J. Biol. Chem. 268:22710-22715; Pepin MC y col. (1995) FEBS Lett 377:368-372). Por estos motivos se sintetizaron péptidos de la zona extracelular de este receptor suponiendo que estos péptidos podrían ser capaces de secuestrar el TGF β 1 circulante.

En la Tabla 4 se muestran los péptidos sintetizados.

Tabla 4. Péptidos procedentes del receptor tipo III de rata. Se indica el número del péptido y su secuencia. P39 a P65 son péptidos predichos como complementarios al TGF β 1 y P66 a P138 son péptidos solapados que cubren la región extracelular del receptor. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

	<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>
	P39 (91-102)	AsnProIleAlaSerValHisThrHisHisLysPro
	P40 (104-115)	ValPheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuValTrp
35	P41 (109-120)	SerProGlnProLeuValTrpHisLeuLysThrGlu
	P42 (110-121)	ProGlnProLeuValTrpHisLeuLysThrGluArg
	P43 (333-344)	TrpAlaLeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSer
	P44 (428-439)	ProIleValProSerValGlnLeuLeuProAspHis
40	P45 (555-566)	GlyAspGluGlyGluThrAlaProLeuSerArgAla
	P46 (563-574)	LeuSerArgAlaGlyValValValPheAsnCysSer
	P47 (603-614)	LeuPheLeuValProSerProGlyValPheSerVal
	P48 (605-616)	LeuValProSerProGlyValPheSerValAlaGlu
45	P49 (707-718)	GluLeuThrLeuCysSerArgLysLysGlySerLeu
	P50 (712-723)	SerArgLysLysGlySerLeuLysLeuProArgCys
	P51 (717-728)	SerLeuLysLeuProArgCysValThrProAspAsp
	P52 (722-733)	ArgCysValThrProAspAspAlaCysThrSerLeu
	P53 (727-738)	AspAspAlaCysThrSerLeuAspAlaThrMetIle
50	P54 (731-742)	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTrpThrMetMet
	P55 (732-743)	SerLeuAspAlaThrMetIleTrpThrMetMetGln
	P56 (737-748)	MetIleTrpThrMetMetGlnAsnLysLysThrPhe
	P57 (742-752)	MetGlnAsnLysLysThrPheThrLysProLeuAla
55	P58 (747-758)	ThrPheThrLysProLeuAlaValValLeuGlnVal
	P59 (761-775)	IysGluAsnValProSerThrLysAspSerSerProIleProPro
	P60 (766-780)	SerThrLysAspSerSerProIleProProProProGlnIle

P61 (771-785) SerProIleProProProProProGlnIlePheHisGlyLeuAsp
 P62 (776-790) ProProProGlnIlePheHisGlyLeuAspThrLeuThrValMet
 P63 (781-795) PheHisGlyLeuAspThrLeuThrValMetGlyIleAlaPheAla
 P64 (786-800) ThrLeuThrValMetGlyIleAlaPheAlaAlaPheValIleGly
 P65 (797-809) LeuLeuThrGlyAlaLeuTrpTyrIleTyrSerHis
 P66 (85-59) LeuMetGluSerPheThrValLeuSerGlyCysAlaSerArgGly
 P67 (50-64) ThrValLeuSerGlyCysAlaSerArgGlyThrThrGlyLeuPro
 P68 (55-69) CysAlaSerArgGlyThrThrGlyLeuProArgGluValHisVal
 P69 (60-74) ThrThrGlyLeuProArgGluValHisValLeuAsnLeuArgSer
 P70 (65-79) ArgGluValHisValLeuAsnLeuArgSerThrAspGlnGlyPro
 P71 (70-84) LeuAsnLeuArgSerThrAspGlnGlyProGlyGlnArgGlnArg
 P72 (75-89) ThrAspGlnGlyProGlyGlnArgGlnArgGluValThrLeuHis
 P73 (80-94) GlyGlnArgGlnArgGluValThrLeuHisLeuAsnProIleAla
 P74 (85-99) GluValThrLeuHisLeuAsnProIleAlaSerValHisThrHis
 P75 (90-104) LeuAsnProIleAlaSerValHisThrHisHisLysProIleVal
 P76 (95-109) SerValHisThrHisHisLysProIleValPheLeuLeuAsnSer
 P77 (100-114) HisLysProIleValPheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuVal
 P78 (105-119) PheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuValTrpHisLeuLysThr
 P79 (110-124) ProGlnProLeuValTrpHisLeuLysThrGluArgLeuAlaAla
 P80 (115-129) TrpHisLeuLysThrGluArgLeuAlaAlaGlyValProArgLeu
 P81 (120-134) ArgLeuAlaAlaGlyValProArgLeuPheLeuValSerGluGly
 P82 (125-139) GlyValProArgLeuPheLeuValSerGluGlySerValValGln
 P83 (130-144) PheLeuValSerGluGlySerValValGlnPheProSerGlyAsn
 P84 (135-149) GlySerValValGlnPheProSerGlyAsnPheSerLeuThrAla
 P85 (140-154) PheProSerGlyAsnPheSerLeuThrAlaGluThrGluGluArg
 P86 (145-159) PheSerLeuThrAlaGluThrGluGluArgAsnPheProGlnGlu
 P87 (150-164) GluThrGluGluArgAsnPheProGlnGluAsnGluHisLeuVal
 P88 (155-169) AsnPheProGlnGluAsnGluHisLeuValArgTrpAlaGlnLys
 P89 (160-174) AsnGluHisLeuValArgTrpAlaGlnLysGluTyrGlyAlaVal
 P90 (165-179) ArgTrpAlaGlnLysGluTyrGlyAlaValThrSerPheThrGlu
 P91 (170-184) GluTyrGlyAlaValThrSerPheThrGluLeuLysIleAlaArg
 P92 (175-189) ThrSerPheThrGluLeuLysIleAlaArgAsnIleTyrIleLys
 P93 (180-194) LeuLysIleAlaArgAsnIleTyrIleLysValGlyGluAspGln
 P94 (185-199) AsnIleTyrIleLysValGlyGluAspGlnValPheProProThr
 P95 (190-204) ValGlyGluAspGlnValPheProProThrCysAsnIleGlyLys
 P96 (195-209) ValPheProProThrCysAsnIleGlyLysAsnPheLeuSerLeu
 P97 (200-214) CysAsnIleGlyLysAsnPheLeuSerLeuAsnTyrLeuAlaGlu
 P98 (205-219) AsnPheLeuSerLeuAsnTyrLeuAlaGluTyrLeuGlnProLys
 P99 (210-224) AsnTyrLeuAlaGluTyrLeuGlnProLysAlaAlaGluGlyCys
 P100 (215-229) TyrLeuGlnProLysAlaAlaGluGlyCysValLeuProSerGln
 P101 (220-234) AlaAlaGluGlyCysValLeuProSerGlnProHisGluLysGlu
 P102 (225-239) ValLeuProSerGlnProHisGluLysGluValHisIleIleGlu
 P103 (230-244) ProHisGluLysGluValHisIleIleGluLeuIleThrProSer
 P104 (235-249) ValHisIleIleGluLeuIleThrProSerSerAsnProTyrSer
 P105 (240-254) LeuIleThrProSerSerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAsp
 P110 (265-279) AspProGluValValLysAsnLeuValLeuIleLeuLysCysLys
 P111 (270-284) LysAsnLeuValLeuIleLeuLysCysLysLysSerValAsnTrp
 P112 (275-289) IleLeuLysCysLysLysSerValAsnTrpValIleLysSerPhe
 P113 (280-294) LysSerValAsnTrpValIleLysSerPheAspValLysGlyAsn
 P114 (285-299) ValIleLysSerPheAspValLysGlyAsnLeuLysValIleAla
 P115 (290-304) AspValLysGlyAsnLeuLysValIleAlaProAsnSerIleGly
 P106 (245-259) SerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAspIleIleValAspIle
 P107 (250-264) AlaPheGlnValAspIleIleValAspIleArgProAlaGlnGlu
 P108 (255-269) IleIleValAspIleArgProAlaGlnGluAspProGluValVal
 P109 (260-274) ArgProAlaGlnGluAspProGluValValLysAsnLeuValLeu

	P116 ₍₂₉₅₋₃₀₉₎	LeuLysValIleAlaProAsnSerIleGlyPheGlyLysGluSer
	P117 ₍₃₀₀₋₃₁₄₎	ProAsnSerIleGlyPheGlyLysGluSerGluArgSerMetThr
	P118 ₍₃₀₅₋₃₁₉₎	PheGlyLysGluSerGluArgSerMetThrMetThrLysLeuVal
5	P119 ₍₃₁₀₋₃₂₄₎	GluArgSerMetThrMetThrLysLeuValArgAspAspIlePro
	P120 ₍₃₁₅₋₃₂₉₎	MetThrLysLeuValArgAspAspIleProSerThrGlnGluAsn
	P121 ₍₃₂₀₋₃₃₄₎	ArgAspAspIleProSerThrGlnGluAsnLeuMetLysTrpAla
10	P122 ₍₃₂₅₋₃₃₉₎	SerThrGlnGluAsnLeuMetLysTrpAlaLeuAspAsnGlyTyr
	P123 ₍₃₃₀₋₃₄₄₎	LeuMetLysTrpAlaLeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSer
	P124 ₍₃₃₅₋₃₄₉₎	LeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSerTyrThrMetAlaPro
	P125 ₍₃₄₀₋₃₅₄₎	ArgProValThrSerTyrThrMetAlaProValAlaAsnArgPhe
15	P126 ₍₃₄₅₋₃₅₉₎	TyrThrMetAlaProValAlaAsnArgPheHisLeuArgLeuGlu
	P127 ₍₃₅₀₋₃₆₄₎	ValAlaAsnArgPheHisLeuArgLeuGluAsnAsnGluGluMet
	P128 ₍₃₅₅₋₃₆₉₎	HisLeuArgLeuGluAsnAsnGluGluMetArgAspGluGluVal
	P129 ₍₃₆₀₋₃₇₄₎	AsnAsnGluGluMetArgAspGluGluValHisThrIleProPro
	P130 ₍₃₆₅₋₃₇₉₎	ArgAspGluGluValHisThrIleProProGluLeuArgIleLeu
20	P131 ₍₃₇₀₋₃₈₄₎	HisThrIleProProGluLeuArgIleLeuLeuAspProAspHis
	P132 ₍₃₇₅₋₃₈₉₎	GluLeuArgIleLeuLeuAspProAspHisProProAlaLeuAsp
	P133 ₍₃₈₀₋₃₉₄₎	LeuAspProAspHisProProAlaLeuAspAsnProLeuPhePro
	P134 ₍₃₈₅₋₃₉₉₎	ProProAlaLeuAspAsnProLeuPheProGlyGluGlySerPro
25	P135 ₍₃₉₀₋₄₀₄₎	AsnProLeuPheProGlyGluGlySerProAsnGlyGlyLeuPro
	P136 ₍₃₉₅₋₄₀₉₎	GlyGluGlySerProAsnGlyGlyLeuProPheProPheProAsp
	P137 ₍₄₀₀₋₄₁₄₎	AsnGlyGlyLeuProPheProPheProAspIleProArgArgGly
	P138 ₍₄₀₅₋₄₁₉₎	PheProPheProAspIleProArgArgGlyTrpLysGluGlyGlu

Los péptidos de la Tabla 4 se ensayaron en cuanto a su capacidad de bloquear el TGF- β 1 en el modelo de inhibición de la línea celular MV-1-Lu. Puesto que el TGF- β 1 es capaz de inhibir el crecimiento de esta línea, la inhibición del TGF- β 1 por parte de los péptidos sería capaz de restablecer el crecimiento celular. Estos ensayos se muestran en las Figuras 9 a 12.

Como se puede ver en las Figuras 9 a 12 existen varios péptidos capaces de inhibir en mayor o menor grado el crecimiento de la línea celular MV-1-Lu, aunque sólo el péptido P54 es capaz de inhibir casi por completo la actividad del TGF- β 1. Con el fin de realizar un estudio más a fondo de este péptido se realizaron ensayos utilizando diferentes concentraciones de péptido frente a una concentración fija de TGF- β 1 de 200 μ g/ml.

Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGF- β 1 por el péptido P54

Se estudió el efecto de la concentración del péptido P54 sobre la inhibición de la actividad del TGF- β 1. Debido a la poca solubilidad de este péptido se prepararon soluciones madre de concentración nominal de péptido, tal y como se hizo en el caso del péptido P12, a partir de ellas se tomaron alícuotas que se filtraron o bien se usaron directamente para los ensayos de inhibición.

En la Figura 13 se estudia el efecto inhibidor de concentraciones nominales de péptido, antes y después de filtrar. Se observa que en el filtrado del péptido P54 no hay actividad inhibitoria medible.

Una vez comprobada la capacidad del péptido P54 de inhibir la actividad del TGF- β 1 de una manera dependiente de la dosis utilizada se procedió a sintetizar nuevos péptidos, tomando como base la secuencia del P54, con el fin de intentar mejorar la solubilidad y con ello su actividad a dosis más bajas. También se sintetizaron dos péptidos procedentes del receptor de tipo III humano. Uno de estos péptidos (P144) es equivalente al péptido P54. El otro péptido (P145) es similar al péptido P106 del receptor de tipo III de rata que también habla mostrado actividad. Estos nuevos péptidos se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Péptidos procedentes de la modificación del péptido P54 (péptidos P139 a P143) y del receptor de tipo III humano (péptidos P144 y P145).

Péptido	Secuencia	Procedencia
P54 ₍₇₃₁₋₇₄₂₎	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTrpThrMetMet	Receptor Tipo III Rata
P139	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTrpAspAspAsp	
P140	AspAspAspAlaThrMetIleTrpThrMetMet	
P141	AspAlaThrMetIleTrpAsp	
P142	ThrSerLeuMetIleTrpThrMetMet	
P143	ThrSerLeuAspAlaThrThrMetMet	
P144 ₍₇₂₉₋₇₄₂₎	ThrSerLeuAspAlaSerIleIleTrpAlaMetMet	Receptor Tipo III Humano
P145 ₍₂₄₁₋₂₅₄₎	GlnAsn SerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAspIleThr IleAsp	Receptor Tipo III Humano

El ensayo de actividad de los péptidos de la Tabla 5 se indica en la Figura 14.

Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGF β 1 por el péptido P144

Se realizó un ensayo dosis respuesta con el péptido P144 procedente de la secuencia del receptor tipo III humano, con el fin de comprobar si su actividad era dependiente de la concentración (Figura 15). Se puede ver como la actividad del péptido decae conforme se disminuye la concentración de péptido utilizada en los ensayos.

Ensayos de inhibición de la unión del TGF β 1 a sus receptores por el péptido P144 (marcaje por afinidad)

El péptido P144 procedente de la secuencia del receptor de tipo III humano, se utilizó en los ensayos de marcaje por afinidad para comprobar su capacidad de inhibición de la unión del TGF β 1 a sus receptores celulares (Material y Métodos).

Debido a la diferente actividad de los lotes de ^{125}I -TGF β 1 empleados, las concentraciones de péptido utilizadas en los ensayos se ajustaron en función de la concentración del lote ^{125}I -TGF β 1 utilizado en cada caso. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 15.

Una vez comprobada la inhibición de la unión del TGF β 1 a sus receptores celulares mediante el péptido P144, se realizó un nuevo ensayo con el fin de titular el péptido P144. Se observó que el péptido perdía su actividad a la concentración de 2×10^5 veces la concentración molar de ^{125}I -TGF β 1.

Inhibición del TGF β 1 mediante péptidos procedentes de otras proteínas con capacidad de unirse al TGF β 1 y dichos como complementarios al TGF β 1

En esta serie se sintetizaron los péptidos de la Tabla 6 procedentes de proteínas capaces de unirse al TGF β 1.

Tabla 6. Péptidos procedentes de distintas proteínas capaces de unirse al TGF β I (receptor tipo II P146, fetuina P147 a P149, endoglina P150 a P154 y α 2-Macroglobulina P155 a P179). Se indica el número del péptido junto a su posición en la secuencia completa, su secuencia de aminoácidos, así como su procedencia. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

	Péptidos	Secuencia	Procedencia
10	P146 ₍₈₄₋₁₀₁₎	CysValAlaValTrpArgLysAsnAspGluAsnIleThr LeuGluThrValCys	Receptor Tipo II II
	P147 ₍₁₁₄₋₁₃₂₎	CysAspPheGlnLeuLeuLysLeuAspGlyLysPheSer ValValTyrAlaLysCys	Fetuina
15	P148 ₍₁₁₄₋₁₃₂₎	CysAspPheHisIleLeuLysGlnAspGlyGlnPheArg ValCysHisAlaGlnCys	Fetuina
	P149 ₍₁₁₄₋₁₃₂₎	CysAspIleHisValLeuLysGlnAspGlyPheSerVal LeuPheThrLysCysAsp	Fetuina
20	P150 ₍₂₄₇₋₂₆₁₎	GluAlaValLeuIleLeuGlnGlyProProTyrValSer TrpLeu	Endoglina
	P151 ₍₂₈₉₋₃₀₃₎	ValAsnLeuProAspThrArgGlnGlyLeuLeuGluGlu AlaArg	Endoglobina
	P152 ₍₄₄₅₋₄₅₉₎	LeuAspSerLeuSerPheGlnLeuGlyLeuTyrLeuSer ProHis	Endoglina
25	P153 ₍₄₈₁₋₄₉₅₎	ProSerIleProGluLeuMetThrGlnLeuAspSerCys GlnLeu	Endoglina
	P154 ₍₄₇₉₋₄₉₃₎	MetSerProSerIleProGluLeuMetThrGlnLeuAsp SerCys	Endoglina
30	P155 ₍₁₃₋₂₄₎	LeuLeuLeuLeuValLeuLeuProThrAspAlaSer	α 2-Macroglobulina
	P156 ₍₂₀₋₃₁₎	ProThrAspAlaSerValSerGlyLysProGlnTyr	α 2-Macroglobulina
	P157 ₍₄₄₋₅₅₎	ThrGluLysGlyCysValLeuLeuSerTyrLeuAsn	α 2-Macroglobulina
35	P158 ₍₁₆₆₋₁₇₇₎	TyrIleGlnAspProLysGlyAsnArgIleAlaGln	α 2-Macroglobulina
	P158 ₍₁₆₆₋₁₇₇₎	TyrIleGlnAspProLysGlyAsnArgIleAlaGln	α 2-Macroglobulina
	P159 ₍₁₉₂₋₂₀₃₎	PheProLeuSerSerGluProPheGlnGlySerTyr	α 2-Macroglobulina
	P160 ₍₂₄₇₋₂₅₈₎	AsnValSerValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLys	α 2-Macroglobulina
40	P161 ₍₂₄₈₋₂₅₉₎	ValSerValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLysPro	α 2-Macroglobulina
	P162 ₍₂₅₀₋₂₆₁₎	ValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLysProValPro	α 2-Macroglobulina
	P163 ₍₂₆₇₋₂₇₈₎	SerIleCysArgLysTyrSerAspAlaSerAspCys	α 2-Macroglobulina
45	P164 ₍₄₆₉₋₄₈₀₎	ProCysGlyHisThrGlnThrValGlnAlaHisTyr	α 2-Macroglobulina
	P165 ₍₅₅₄₋₅₆₅₎	AspSerAlaLysTyrAspValGluAsnCysLeuAla	α 2-Macroglobulina
	P167 ₍₇₉₀₋₈₀₁₎	GlnProPhePheValGluLeuThrMetProTyrSer	α 2-Macroglobulina
	P168 ₍₈₂₇₋₈₃₈₎	GlnLeuGluAlaSerProAlaPheLeuAlaValPro	α 2-Macroglobulina
50	P169 ₍₈₃₅₋₈₃₆₎	SerValGlnLeuGluAlaSerProAlaPheLeuAla	α 2-Macroglobulina
	P170 ₍₈₇₆₋₈₈₇₎	AlaLeuGluSerGlnGluLeuCysGlyThrGluVal	α 2-Macroglobulina
	P171 ₍₁₀₀₁₋₁₀₁₂₎	LysSerLysIleGlyTyrLeuAsnThrGlyTyr	α 2-Macroglobulina

P172 ₍₁₀₀₅₋₁₀₁₆₎	IleGlyTyrLeuAsnThrGlyTyrGlnArgGlnLeu	α 2-Macroglobulina
P173 ₍₁₀₆₇₋₁₀₇₃₎	LysArgLysGluValLeuLysSerLeuAsnGluGlu	α 2-Macroglobulina
P174 ₍₁₁₉₃₋₁₂₀₄₎	ValGlyHisPheTyrGluProGlnAlaProSerAla	α 2-Macroglobulina
P175 ₍₁₂₀₉₋₁₂₂₀₎	ThrSerTyrValLeuLeuAlaTyrLeuThrGlnAla	α 2-Macroglobulina
P176 ₍₁₂₁₁₋₁₂₂₂₎	TyrValLeuLeuAlaTyrLeuThrAlaGlnProAla	α 2-Macroglobulina
P177 ₍₁₂₅₆₋₁₂₆₇₎	ValAlaLeuHisAlaLeuSerLysTyrGlyAlaAla	α 2-Macroglobulina
P178 ₍₁₂₃₂₋₁₂₄₃₎	TyrGlyArgAsnGlnGlyAsnThrTrpLeuThrAla	α 2-Macroglobulina
P179 ₍₁₂₃₄₋₁₂₄₅₎	ArgAsnGlnGlyAsnThrTrpLeuThrAlaPheVal	α 2-Macroglobulina

En las Figuras 17 y 18 se indica la actividad inhibitoria de los péptidos procedentes de la Tabla 10.

Como puede observarse en las Figuras 17 y 18 sólo el péptido P150 mostró actividad superior al 50%. Sin embargo, los péptidos P146 y P149 que habían sido descritos como activos por Demetriou M y col (1996) J Biol Chem 271:12755-12761 no resultaron activos en las condiciones utilizadas para este ensayo.

Medición por citometría de flujo del efecto inhibitorio de péptidos sintéticos sobre la unión del TGF β 1 a sus receptores celulares

Péptidos procedentes de síntesis anteriores, tanto los que se sintetizaron a partir de la secuencia del TGF β 1 como del receptor tipo III, se utilizaron para medir, por citometría de flujo, su capacidad inhibitoria de la unión del TGF β 1 a los receptores celulares. En estos ensayos las células se incuban con el péptido antes de añadir el TGF β 1-biotina que se revelará utilizando avidina-FITC (Material y Metodos). Posteriormente se mide la fluorescencia emitida por la avidina-FITC, que será directamente proporcional a la cantidad de TGF β 1 unido a las células e inversamente proporcional a la actividad del péptido. En la Figura 19 y en la Tabla 7 se indican los resultados obtenidos con los péptidos más relevantes.

Tabla 7. Comparación de la actividad inhibitoria del TGF β 1, de algunos péptidos, medida mediante el bioensayo de inhibición del crecimiento de las células MV-1-Lu¹ (concentración de péptido 200 μ g/ml) con la inhibición de la unión del TGF β 1 a sus receptores celulares medida mediante citometría de flujo² (concentración de péptido 420 μ g/ml).

Péptidos	bioensayo (%inhibición) ¹	Cysitometría (%inhibición) ²	Secuencia
P29	77,6	92,34	HisGluProLysGlyTyrHis AlaAsnPheCysLeuGlyPro CysProTyrIleTrpSerLeu AspThr
P11	40	86	HisAlaAsnPheCysLeuGly ProCysProTyrIleTrpSer Leu
P12	96	77	PheCysLeuGlyProCysPro TyrIleTrpSerLeuAspThr
P18	18,2	6,5	LeuTyrAsnGlnHisAsnPro GlyAlaSerAlaAlaProCys Cys
P54	97	82,3	ThrSerLeuAspAlaThrMet IleTrpThrMetMet
P140	-1,7	69,8	AspAspAspAlaThrMetIle TrpThrMetMet
P142	70	72	ThrSerLeuMetIleTrpThr

	P106	40	91	SerAsnProTyrSerAlaPhe GlnValAspIleIleValAsp Ile
5	P145	21	74, 35	SerAsnProTyrSerAlaPhe GlnValAspIleThrIleAsp
	P144	88	80	ThrSerLeuAspAlaSerIle IleTrpAlaMetMetGlnAsn
10	P150	64	73	GluAlaValLeuIleLeuGln GlyProProTyrValSerTrp Leu
	P152	45	68, 4	LeuAspSerLeuSerPheGln LeuGlyLeuTyrLeuSerPro His

Inhibición in vivo de la actividad del TGF β 1.

El péptido P144 procedente de la secuencia del recepto tipo III humano, que habla resultado activo en los bioensayos de inhibición del crecimiento de la línea celular MV-1-Lu. se utilizó en los ensayos *in vivo* para estudiar su efecto inhibitorio en la inducción de cirrosis experimental con CCl₄ en un modelo de ratas.

Modelo de cirrosis experimental en ratas Wistar

En este modelo la cirrosis hepática se induce mediante inhalación de tetracloruro de carbono, durante 11 semanas, dos veces por semana (López Novoa JM y col. (1976) Patología IX:223-240; Camps J. y col. (1987) Gastroenterology 93:498-505) tal y como se indica en Material y Métodos.

El péptido P144 se administró de acuerdo a dos protocolos:

1. Protocolo 1: El péptido se administró en días alternos por vía intraperitoneal durante el proceso de inducción de la cirrosis (11 semanas). Figuras 20 y 21.
2. Protocolo 2: El péptido se administró en días alternos por vía intraperitoneal durante 3 semanas, una vez establecida la cirrosis, es decir a las 12 semanas del inicio de la inducción de la cirrosis. Figuras 22 y 23.

La producción de colágeno en ambos protocolos se midió mediante dos técnicas:

En la Figuras 36 y 38 se indica la producción de colágeno total medida por tinción de cortes de hígado (dos por animal) teñidos con *Fast Green y Direct Red*, elución del color y lectura en espectrofotómetro (Material y Métodos) (López de León A. y Rojkind, (1985) Histochem. Cytochem. 33:737-743; Gaudio E. y col. (1993) Int. J. Exp. Path. 74:463-469).

En las Figuras 21 y 23 se refleja la producción de colágeno medida por análisis de imagen a partir de cortes de hígado teñidos con rojo sirio, utilizando microscopía de luz (Material y Métodos).

Como se puede ver en la Figura 20 se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el grupo de ratas tratadas con el péptido P144 (Tto₁) y el grupo de ratas cirróticas control (Ci₁) al estudiar el cociente colágeno vs proteína total. En la Figura 37 las diferencias entre el grupo de ratas tratadas con el péptido P144 (Tto₁) y el grupo de ratas cirróticas control (Ci₁) también son significativas ($P < 0,001$) al estudiar el área de fibrosis.

Como se puede observar en las figuras 22 y 23, en las que se muestran los resultados de las ratas tratadas una vez establecida la cirrosis, las diferencias entre los grupos de ratas tratadas con el péptido P144 (Tto₂) y las cirróticas sin tratar (Ci₂) no son significativas cuando se utilizan cualquiera de las dos técnicas de medición de fibrosis.

Las dos técnicas utilizadas para la medición de colágeno se compararon entre sí mediante una regresión lineal con el fin de comprobar la aleatoriedad en la elección de los campos a estudio en cada preparación y con ello la validez del análisis de imagen, Figuras 24 y 25.

Como se puede observar en las gráficas 24 y 25 existe una correlación entre ambas técnicas con una $R > 0,85$ en ambos casos, siendo altamente significativa ($F \leq 0,001$). Esto confirma que la adquisición de las imágenes a estudio se realizó de forma totalmente aleatoria y con ello la validez de los datos obtenidos mediante el análisis de imagen.

En la figuras 26 y 27 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de luz a partir de preparaciones de hígado teñidas con rojo sirio a un aumento de 10X obtenidas a partir de hígados de las ratas tratadas durante el proceso de inducción de la cirrosis (Ci_1 y Tto_1).

Las imágenes de la Figura 26 fueron obtenidas sin aplicar ningún tipo de filtro.

La Figura 27 muestra las imágenes una vez modificadas para su estudio mediante un software específico. Estas modificaciones consisten en la aplicación de dos filtros, uno de luz polarizada y el otro de luz verde, con el fin de aumentar la calidad de las imágenes y facilitar su estudio de forma automatizada.

En las figuras 26 y 27 se observa que existen diferencias entre las imágenes procedentes de las ratas cirróticas (Ci_1) y las procedentes de las ratas tratadas con el péptido P144 (Tto_1).

Las diferencias de efectividad entre los protocolos 1 y 2 podrían ser debidas a que la producción de TGF β 1 podría ser mucho menor una vez inducida la cirrosis (protocolo 2) que durante el proceso de inducción de cirrosis con CCl_4 (protocolo 1), e incluso podría estar en niveles normales, por lo que el efecto del tratamiento con el péptido P144 sería menos notorio en el protocolo 2 que en el protocolo 1.

Cuando se comparan los grupos de ratas cirróticas no tratadas, al final del proceso de inducción de la cirrosis (Ci_1) con las cirróticas no tratadas, a las 4 semanas de finalizada la inducción (Ci_2) se observa que existen diferencias significativas ($P=0,016$) entre ambos grupos (Figura 28), lo que indicarla que existe una regresión parcial de la cirrosis al eliminar el agente cirrotizante, observación que ha sido publicada por diversos autores (Szende-B y col (1992) *In Vivo* 6:355-361; Columbano A (1996) *Carcinogenesis* 17:395-400).

Estas diferencias de efectividad entre los dos protocolos también podrían ser debidas al propio protocolo ya que los animales del protocolo 2 se trataron sólo durante 3 semanas en días alternos, mientras que los animales del protocolo 1 se trataron por un periodo más amplio de tiempo (7 semanas, también en días alternos).

Los resultados obtenidos demuestran que es posible inhibir al TGF β 1 tanto *in vitro* como *in vivo* mediante péptidos sintéticos procedentes de diferentes proteínas. En un futuro sería de gran interés intentar aumentar la actividad biológica de estos péptidos. Ello podría llevarse a cabo remplazando sistemáticamente cada uno de los aminoácidos de sus secuencias por los 19 restantes. Una vez alcanzado el péptido de mayor actividad convendría preparar mimotopos (McConnell-SJ (1994) *Gene* 151:115-118; Steward-MW (1995) *J. Virol.* 69:7668-7673) del mismo con el fin de aumentar la vida media en el organismo del agente inhibidor.

Descripción de las figuras

Figura 1. Inhibición de la unión del TGF β 1 a las células MV-1-Lu por el péptido P144, medida por citometría de flujo. A, imagen obtenida al analizar las células incubadas con TGF β 1 biotinilado y reveladas con avidina-FITC. B, imagen obtenida al analizar las células incubadas con avidina-FITC sin previa adición de TGF β 1. C, imagen obtenida al analizar las células incubadas con TGF β 1 previamente incubado con el péptido P144 a una concentración de $0,42 \mu g/\mu l$, el revelado se realizó con avidina-FITC. En abscisas se indica la fluorescencia emitida y en ordenadas el número de células para cada valor de fluorescencia. También se indican los campos correspondientes a las células marcadas con el TGF β 1-biotina y avidina-FITC (M2) y a las células no marcadas (M1).

Figura 2. Esquema representativo del proceso de cirrosis por CCl_4 . Con flechas negras se indica cuando se administro a las ratas dos dosis semanales de CCl_4 y con flechas negras discontinuas cuando fue una dosis semanal. Las flechas grises indican la administración del péptido P144. A: Controles sanos; B: Controles sanos + P144, B $_1$: con péptido $70 \mu g/día$; C: Cirróticos; C $_1$ con salino; C $_2$ con péptido $70 \mu g/día$; D: Cirróticos con CCl_4 + Fenobarbital; D $_1$ y salino; D $_2$ y péptido $70 \mu g/día$.

Figura 3. Efecto del TGF β 1 sobre el crecimiento de células MV-1-Lu. Las células se cultivaron a una densidad de 5000 células/pocillo a las concentraciones de TGF β 1, en pg/ml indicadas. Abscisas: Concentración TGF β 1 (pg/ml); Ordenadas: c.p.m.

Figura 4. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos del TGF β 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P1-P27. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

5 Figura 5. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF β 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones (μ M) nominales del péptido P12 filtrado (\square) y sin filtrar (\blacksquare).

Figura 6. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos del TGF β 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1.

10 Figura 7. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores del TGF β 1. Calle C1: efecto de la incubación de las células con una concentración 0.16 μ M de 125 I-TGF β 1 que se corresponde con una actividad de 0.3 μ Ci (control positivo). Calle C2: efecto de la preincubación de las células con una concentración de TGF β 1 no radioactivo 10 veces superior a la de 125 I-TGF β 1 (control negativo). Calle C3: la preincubación se realizó con el péptido P29 a una concentración 10⁶ veces superior a la concentración molar de 125 I-TGF β 1. Se puede observar la inhibición de la unión del 125 I-TGF β 1 a los receptores celulares tipo I, II y III tanto por parte del péptido P29 como por el TGF β 1 no radioactivo.

20 Figura 8. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores (I, II y III) del TGF β 1. Calles C1 a C6: efecto de la preincubación de las células MV-1-Lu, con distintas concentraciones del péptido P29 (10⁶, 8x10⁵, 6x10⁵, 4x10⁵, 2x10⁵, 10⁵ veces la concentración molar de 125 I-TGF β 1 respectivamente), previas a la adición del 125 I-TGF β 1. Calle C7: efecto de la preincubación de las células MV-1-Lu con TGF β 1 no marcado (10² veces la concentración molar de 125 I-TGF β 1) previa a la adición del 125 I-TGF β 1 (control negativo). Calle C8: efecto de la incubación de las células MV-1-Lu con una concentración 0.42 μ M de 125 I-TGF β 1 que se corresponde con una actividad de 0.4 μ Ci, sin preincubaciones previas (control positivo).

25 Figura 9. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos del receptor predichos como complementarios a zonas del TGF β 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P39-P65. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

30 Figura 10. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P66-P91. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

35 Figura 11. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P92-P115. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

40 Figura 12. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P116-P138. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

45 Figura 13. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF β 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones (μ M) nominales del péptido P54 filtrado (\square) y sin filtrar (\bullet).

50 Figura 14. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos del receptor procedentes de la modificación del péptido P54 (P139 a P143) y de los péptidos procedentes del receptor de tipo III humano (P144 y P145). Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1.

55 Figura 15. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF β 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones (μ M) nominales del péptido P144 sin filtrar.

Figura 16. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores (I, II y III) del TGF β 1. Calle C1: la preincubación se realizó con el péptido P144 a una concentración 10^6 veces superior a la concentración molar de ^{125}I -TGF β 1. Calles C2 y C3: efecto de la preincubación de las células con una concentración de TGF β 1 no radioactivo 10 veces superior a la de ^{125}I -TGF β 1 (control negativo). Calle C4 y C5: efecto de la incubación de las células con una concentración 0,1 μM de ^{125}I -TGF β 1 que se corresponde con una actividad de 0,2 μCi (control positivo). Se puede observar la inhibición de la unión del ^{125}I -TGF β 1 a los receptores celulares tanto por parte del péptido P144 como por el TGF β 1 no radioactivo.

Figura 17. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos procedentes del receptor tipo II humano (P146), de la fetuina (P147 a P149) y de la endoglinina (P150 a P154). Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1.

Figura 18. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos procedentes de la α 2-Macroglobulina. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. Una inhibición del TGF β 1 del 100 % se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P155-P179. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

Figura 19. Porcentaje de inhibición de la unión del TGF β 1 a células MV-1-Lu por diferentes péptidos sintéticos. La inhibición se estudió midiendo el porcentaje de células marcadas (emiten fluorescencia) y sin marcar (no emiten fluorescencia) para cada péptido.

Figura 20. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno durante la inducción de cirrosis experimental con CCl_4 . En ordenadas se indica el cociente colágeno vs proteína total. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido P144; Tto $_1$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos durante este periodo y Ci $_1$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 durante 11 semanas y que no son tratadas con el péptido P144.

Figura 21. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno durante la inducción de cirrosis experimental con CCl_4 . En ordenadas se indica el cociente entre el área de fibrosis y el área total en preparaciones de tejido teñidas con rojo sirio. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto $_1$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos durante este periodo y Ci $_1$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 durante 11 semanas y que no son tratadas con el péptido P144.

Figura 22. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno una vez inducida la cirrosis con CCl_4 . En ordenadas se indica el cociente colágeno vs proteína total. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto $_2$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos al final de este periodo y Ci $_2$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 durante 11 semanas y que no son tratadas con el péptido P144.

Figura 23. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno una vez inducida la cirrosis con CCl_4 . En ordenadas se indica el cociente entre el área de fibrosis y el área total en preparaciones de tejido. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto $_2$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos al final de este periodo y Ci $_2$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 durante 11 semanas y que no son tratadas con el péptido P144.

Figura 24. Comparación entre los datos sobre cantidad de colágeno y área de fibrosis, obtenidos mediante las dos técnicas utilizadas. En el eje de abcisas se indican los valores del cociente entre el área de fibrosis y el área total, obtenidos mediante el análisis de imagen. En ordenadas se indican los valores del cociente entre los μg de colágeno y los mg de proteína total, obtenidos mediante el análisis por espectro fotometría de cortes de hígado teñidos con "Direct Red y Fast Green". Se indica la R^2 . ($F \leq 0.001$).

Figura 25. Comparación entre los datos sobre cantidad de colágeno y área de fibrosis, obtenidos mediante las dos técnicas utilizadas para el estudio de las muestras al final del protocolo 2. En el eje de abcisas se indican los valores del cociente entre el área de fibrosis y el área total, obtenidos mediante el análisis de imagen. En ordenadas se indican los valores del cociente entre los μg de colágeno y los mg de proteína total, obtenidos mediante el análisis por espectrofotometría de cortes de hígado teñidos con "Direct Red y Fast Green". Se indica la R^2 . ($F \leq 0.001$).

Figura 26. Imágenes representativas de los 24 campos obtenidos por microscopía de luz (10X) a partir de preparaciones de hígados de ratas teñidas con rojo sirio. Ratas cirróticas (Ci₁) al final de la inducción de cirrosis con CCl₄ y cirróticas tratadas (Tto₁) con el péptido P144 durante el proceso de inducción de la cirrosis con CCl₄. Se tomaron diferentes campos a partir de las preparaciones procedentes de cada animal (R= rata y C= campo).

Figura 27. Imágenes representativas de los 24 campos obtenidos por microscopía de luz (10X) a partir de preparaciones de hígados de ratas teñidas con rojo sirio. Ratas cirróticas (Ci₁) al final de la inducción de cirrosis con CCl₄ y cirróticas tratadas (Tto₁) con el péptido P144 durante el proceso de inducción de la cirrosis con CCl₄. Se tomaron diferentes campos a partir de las preparaciones procedentes de cada animal (R= rata y C= campo). Se ha utilizado luz polarizada y filtro verde con el fin de resaltar las fibras de colágeno.

Figura 28. Comparación entre los dos grupos de ratas cirróticas no tratadas. Ci₁ son ratas cirróticas al final de las 12 semanas de inducción de la cirrosis con CCl₄. Ci₂ son ratas cirróticas a las 4 semanas del final del proceso de inducción de la cirrosis. P=0,016. ordenadas: Area fibrosis/Area total.

Listado de secuencias

<110> Instituto Científico y Tecnológico de Navarra (ICTN)

<120> Péptidos inhibidores de TGFβ1

<160> 10

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 15

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Procedente de TGFβ1, posición 319-333

<400> His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp
5 10

Ser Leu
15

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 14

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Procedente de TGFβ1, posición 322-335

<400> Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp
5 10

Thr

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 12

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

ES 2 146 552 A1

<223> Deducido como complementario a TGF β 1, posición 731-742

<400> Thr Ser Leu Asp Ala Thr Met Ile Trp Thr Met Met
5 10

5 <210> SEQ ID NO: 4

<211> 15

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

15 <223> Solapado con la región extracelular del receptor tipo III de rata posición
245-259

<400> Ser Asn Pro Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Ile Val
5 10

20 Asp Ile
15

<210> SEQ ID NO: 5

25 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Modificación P54 deducido como complementario a TGFβ1, posición 731-742

35 <400> Thr Ser Leu Met Ile Trp Thr Met Met
 5

<210> SEQ ID NO: 6

40 $\langle 211 \rangle$ 14

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

45 <220> Dominio

<223> Procedente del receptor tipo III humano modificado posición 729-742

<400> Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala Met Met Gln
5 10

Asn

<210> SEQ ID NO: 7

55 $\langle 211 \rangle$ 14

<212> Péptido,

<213> Secuencia artificial

60 <220> Dominio

<223> Procedente del receptor tipo III humano modificado posición 241-254

10

Asp

5 <210> SEQ ID NO: 8

10 <213> Secuencia artificial
 <220> Dominio

¹⁵ <400> Glu Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser
 5 10

20 15
<210> SEQ ID NO: 9

25 <212> Péptido
 <213> Secuencia artificial
 <220> Dominio

<400> Leu Asp Ser Leu Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro
5 10

<210> SEQ ID NO: 10

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<223> Modificación P12, situación 322-335 de TGF.31

Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr
15 20

60

REIVINDICACIONES

1. Péptidos antagonistas de la unión de TGF β 1 a sus receptores en el organismo, **caracterizados** por presentar secuencias de aminoácidos parciales idénticas o similares a las del propio TGF β 1 y/o sus receptores.
2. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.
3. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.
4. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.
5. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4.
6. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.
7. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.
8. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7.
9. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8.
10. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9.
11. Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10.
12. Mimotopos de cualquiera de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizados** por presentar un efecto antagonista similar a los mismos y una mayor vida media en el organismo que éstos.
13. Utilización de al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 y/o al menos uno de sus mimotopos para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas.
14. Utilización de al menos un ADN que codifique para al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas que incluya opcionalmente al menos uno de los mimotopos de dichos péptidos activos.
15. Utilización de al menos un sistema de expresión recombinante que codifique para al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas que incluya opcionalmente al menos uno de los mimotopos de dichos péptidos activos.
16. Utilización de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizada** porque el sistema recombinante es un adenovirus defectivo.
17. Utilización de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizada** porque el sistema recombinante es un plásmido.
18. Utilización de acuerdo con las reivindicaciones 13 a 17, **caracterizada** porque la aplicación es para la fibrosis hepática.

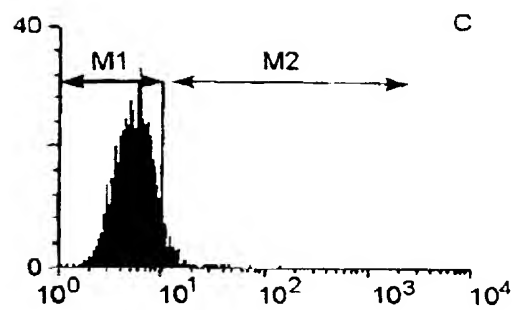
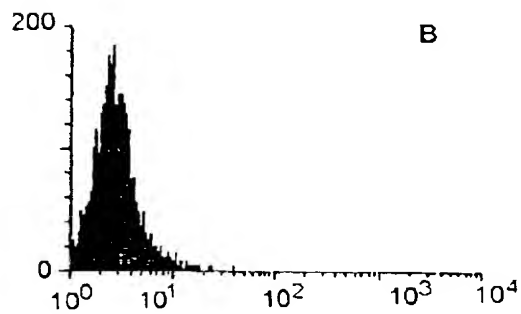
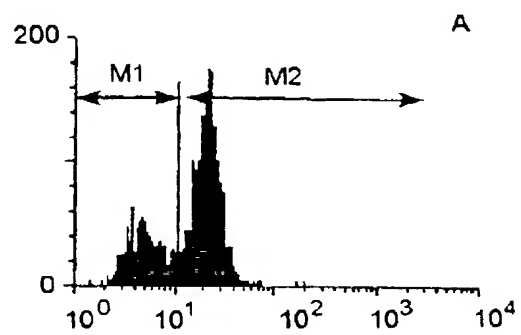


FIGURA 1

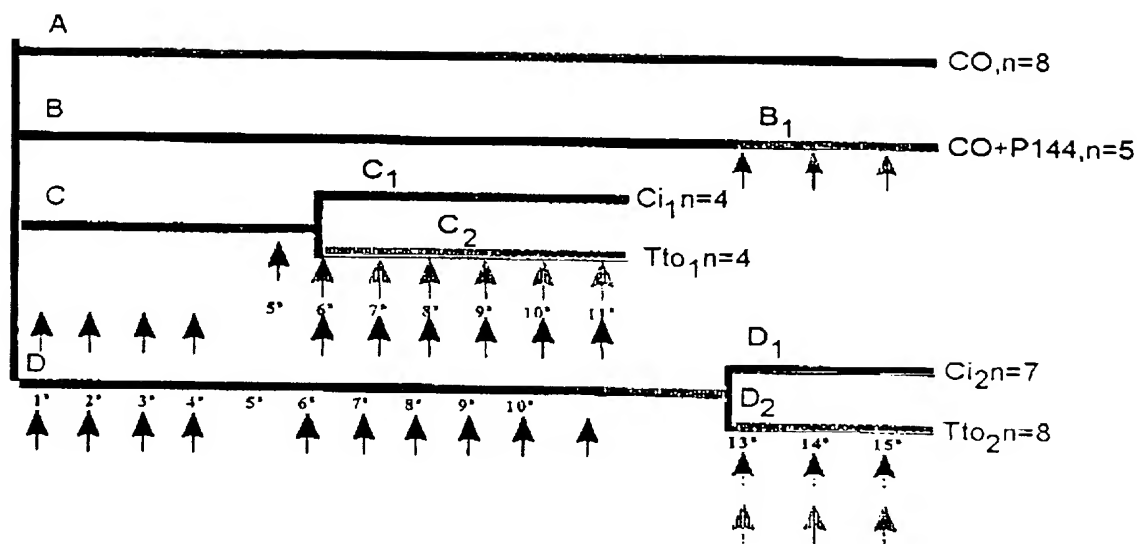


FIGURA 2

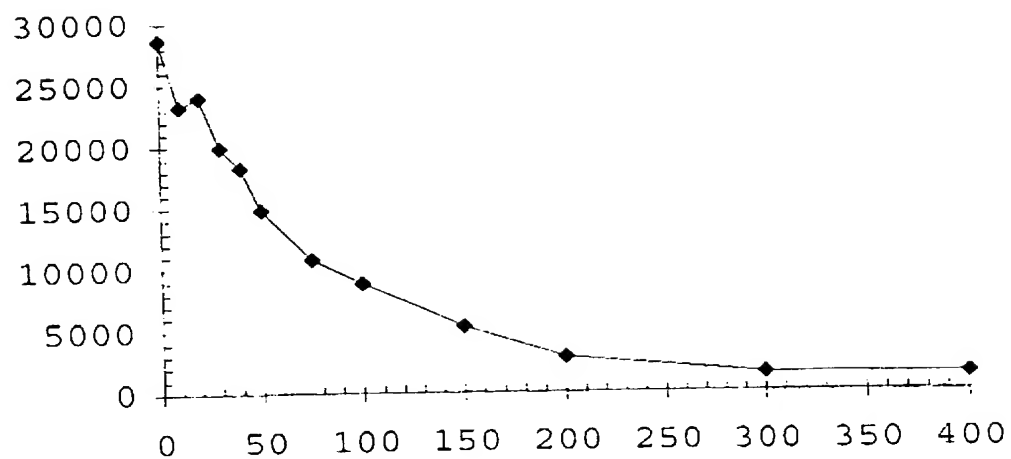


FIGURA 3

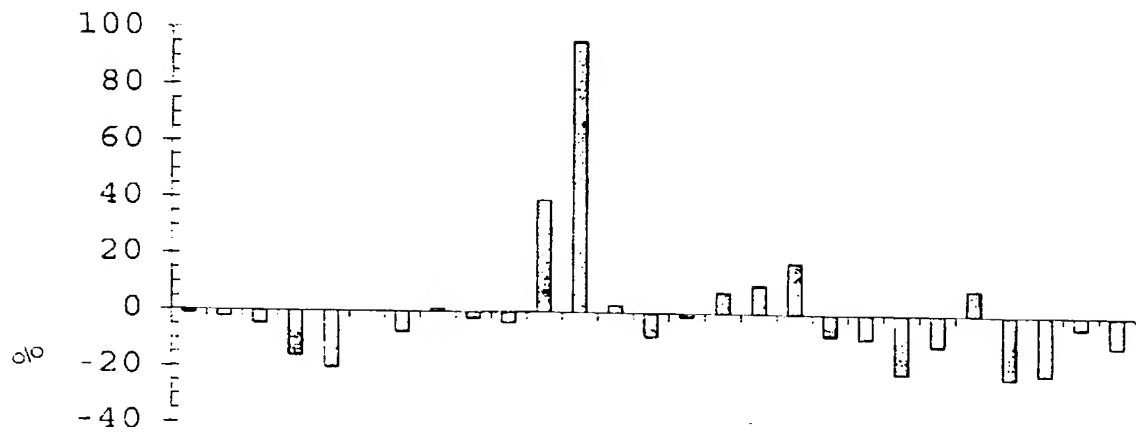


FIGURA 4

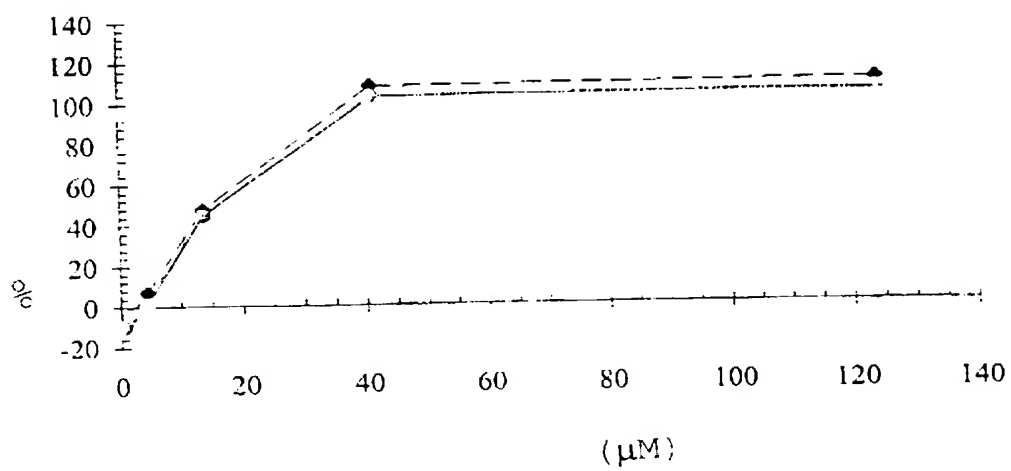


FIGURA 5

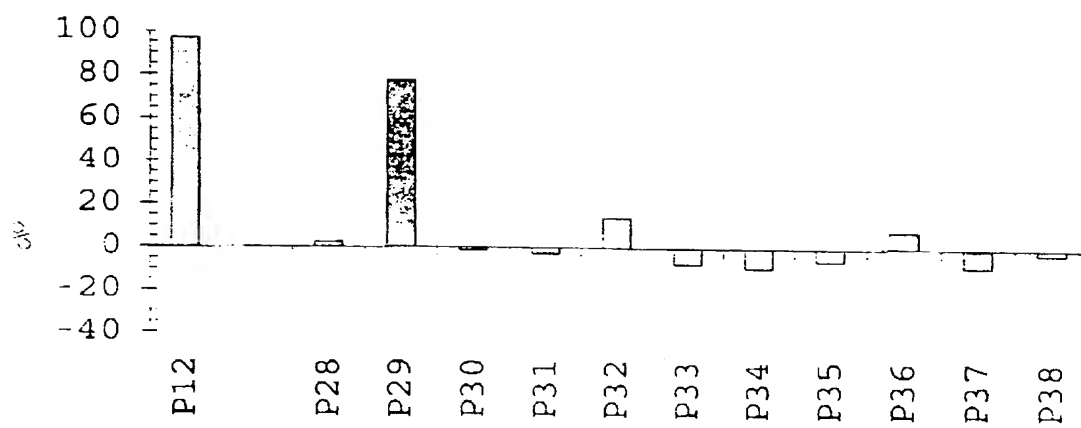


FIGURA 6

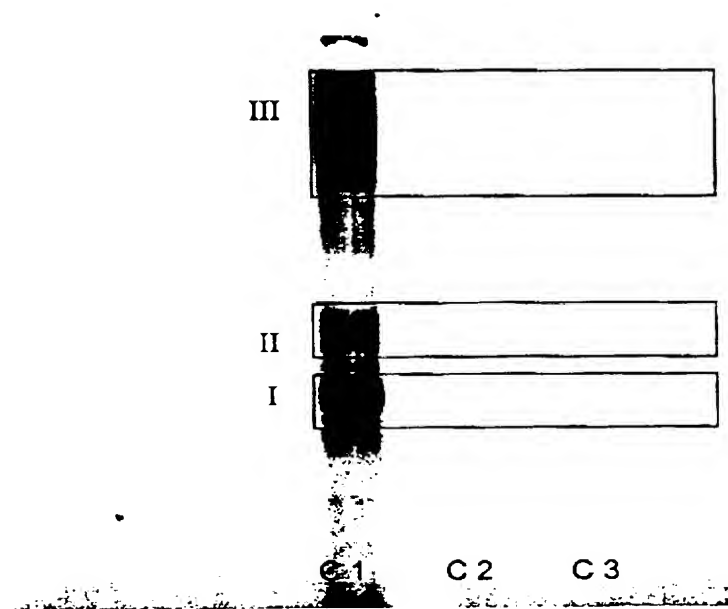


FIGURA 7

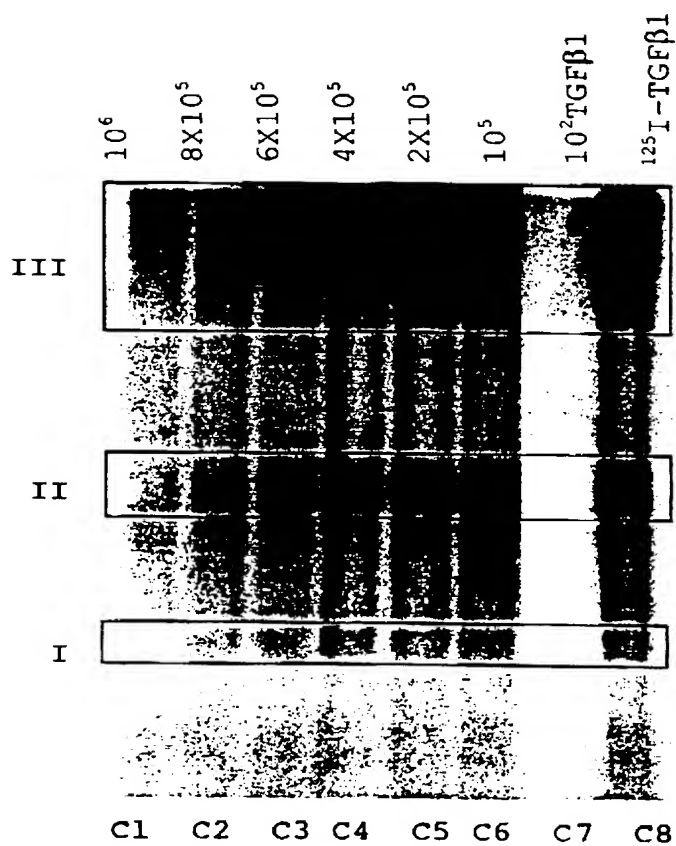


FIGURA 8

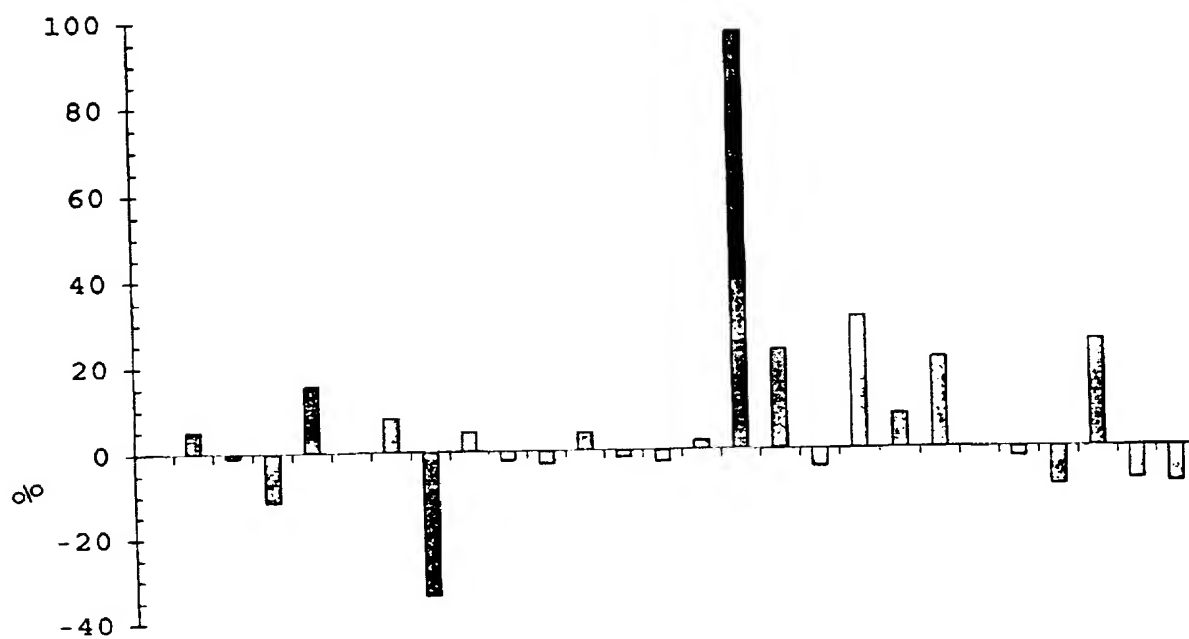


FIGURA 9

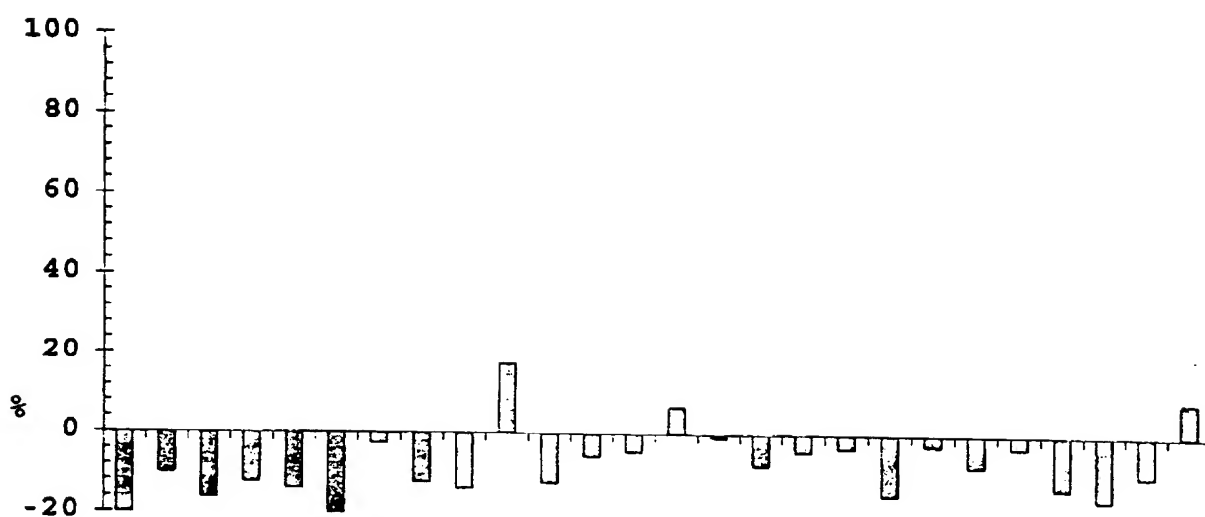


FIGURA 10

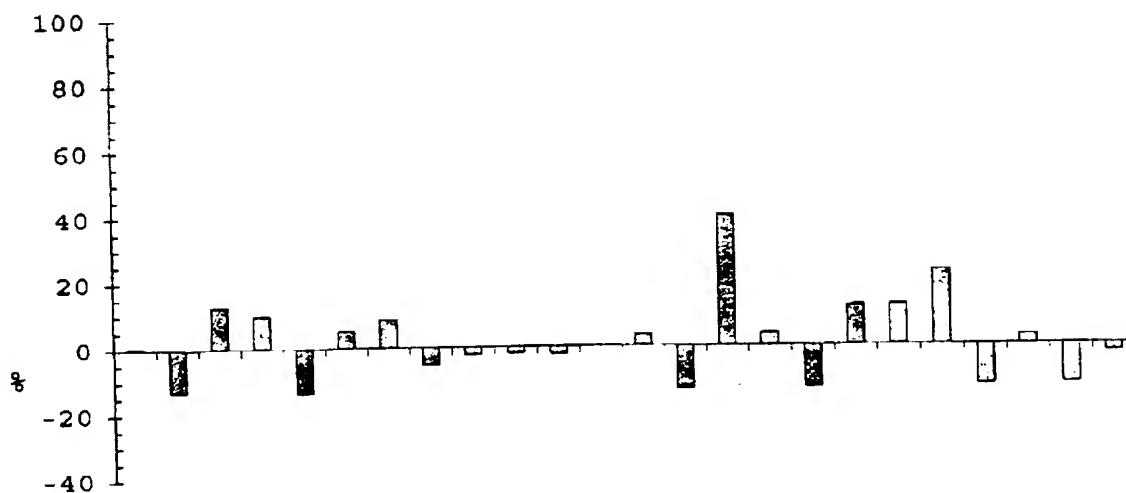


FIGURA 11

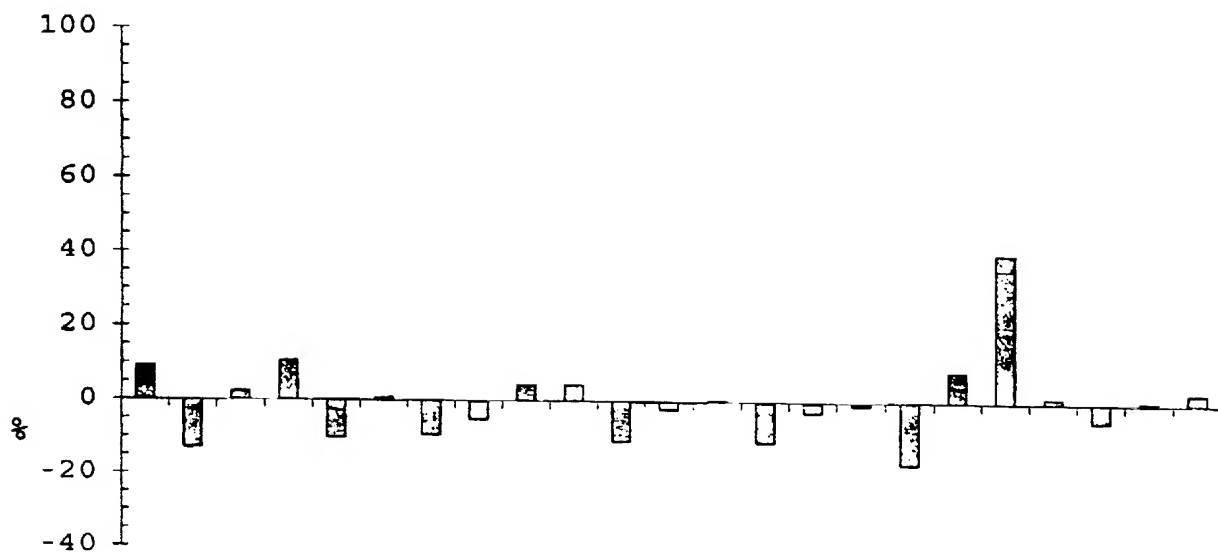


FIGURA 12

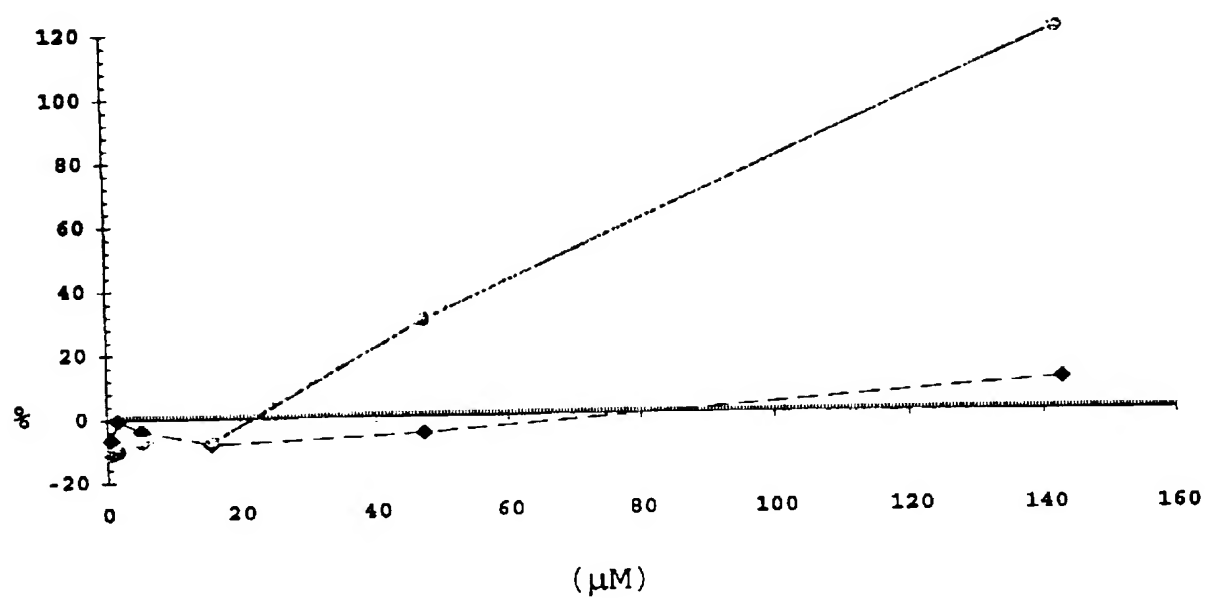


FIGURA 13

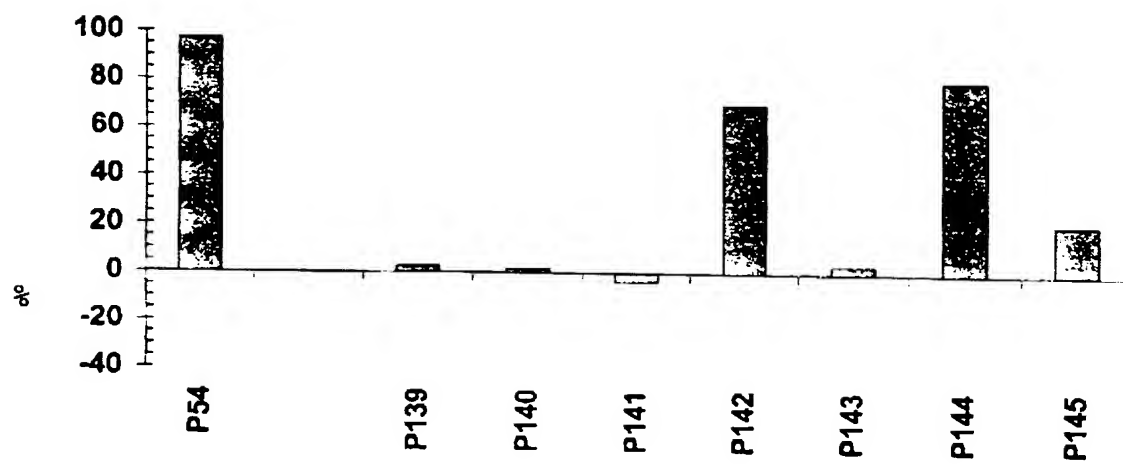


FIGURA 14

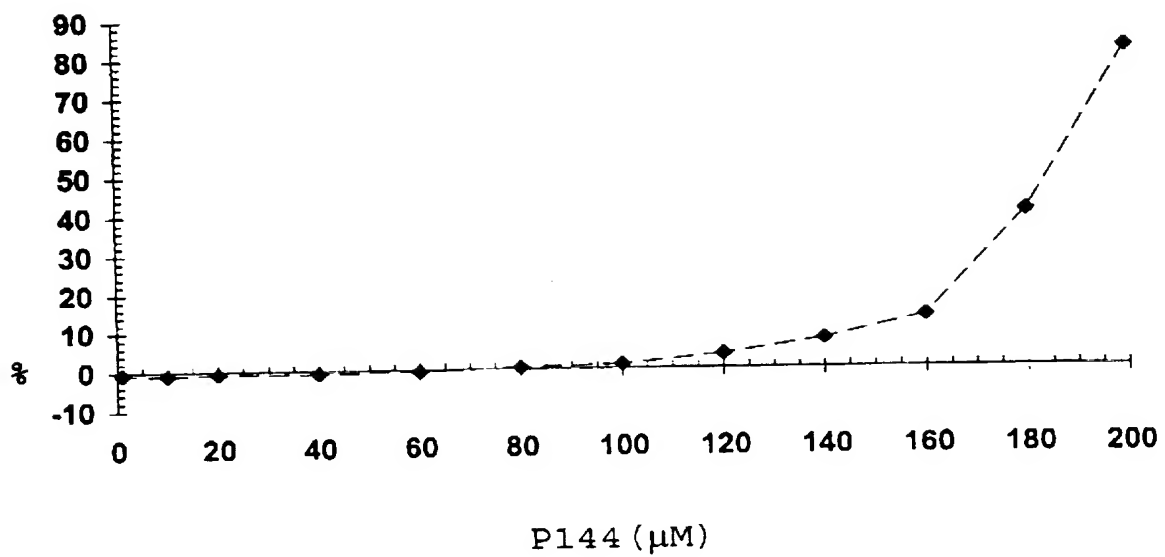


FIGURA 15

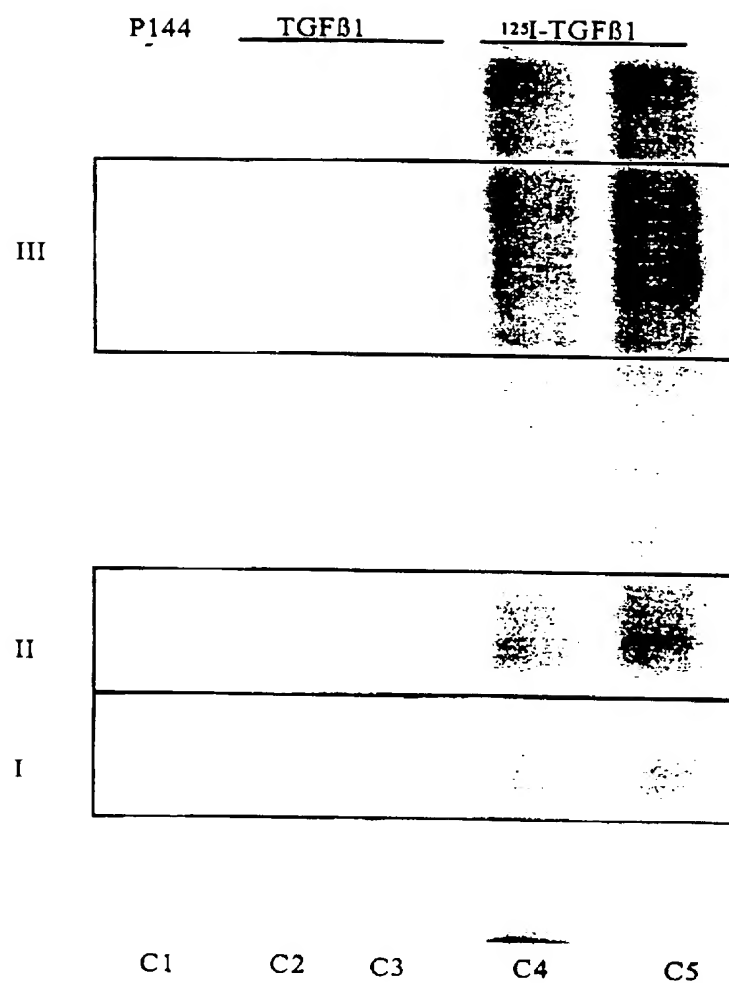


FIGURA 16

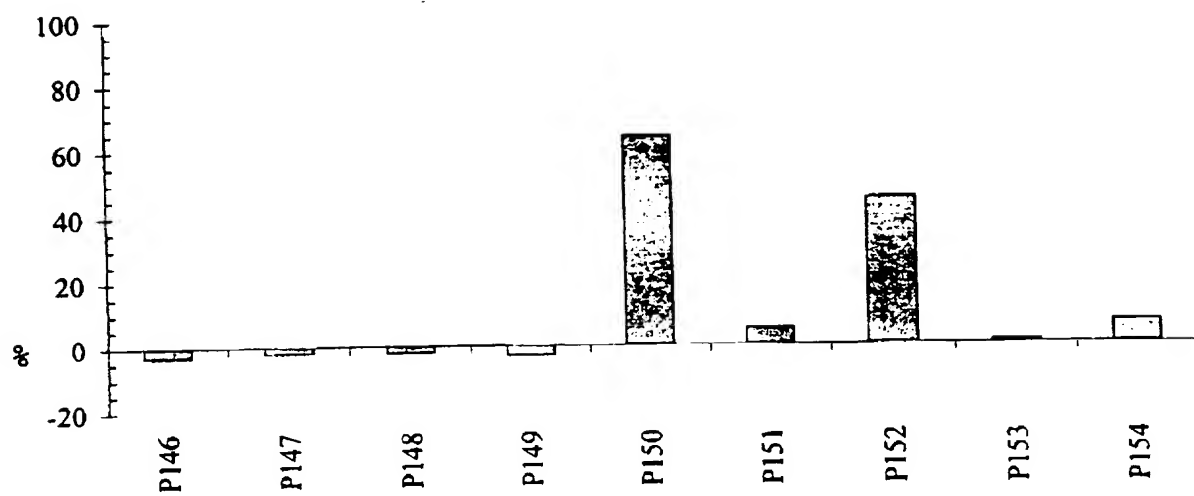


FIGURA 17

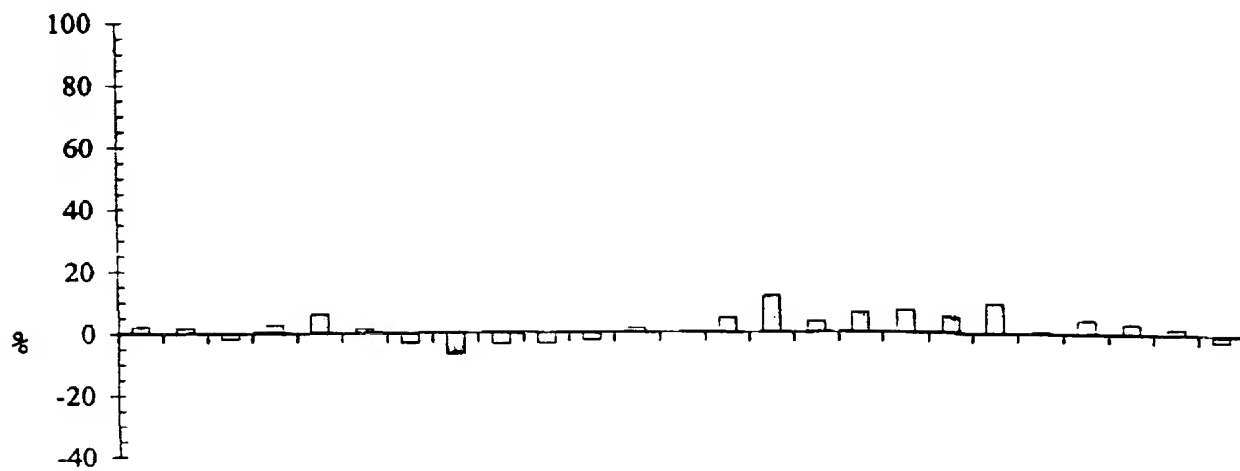


FIGURA 18

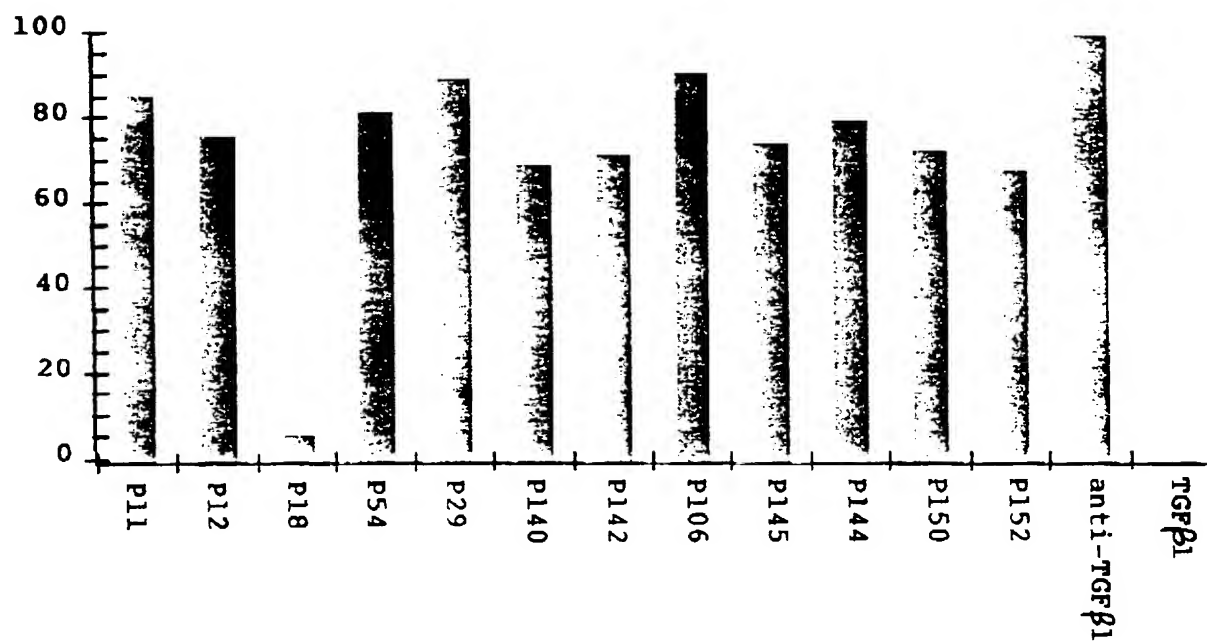


FIGURA 19

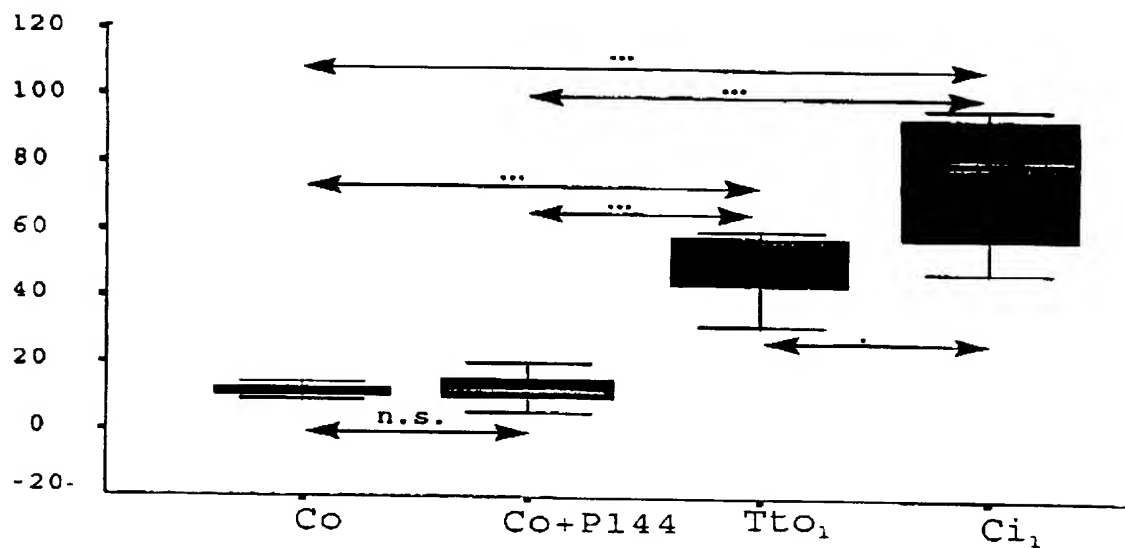


FIGURA 20

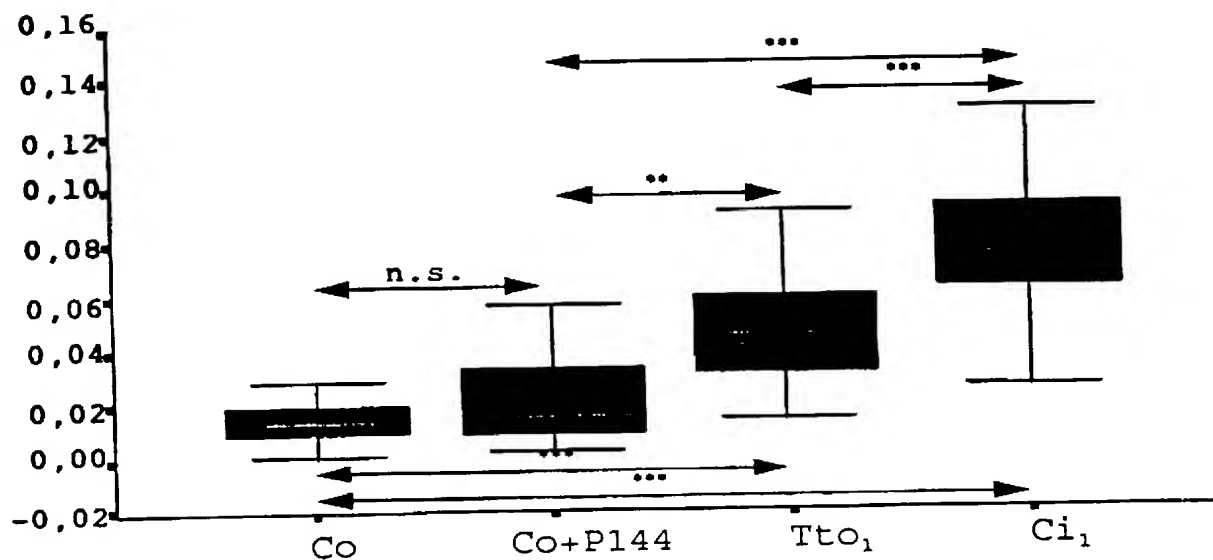


FIGURA 21

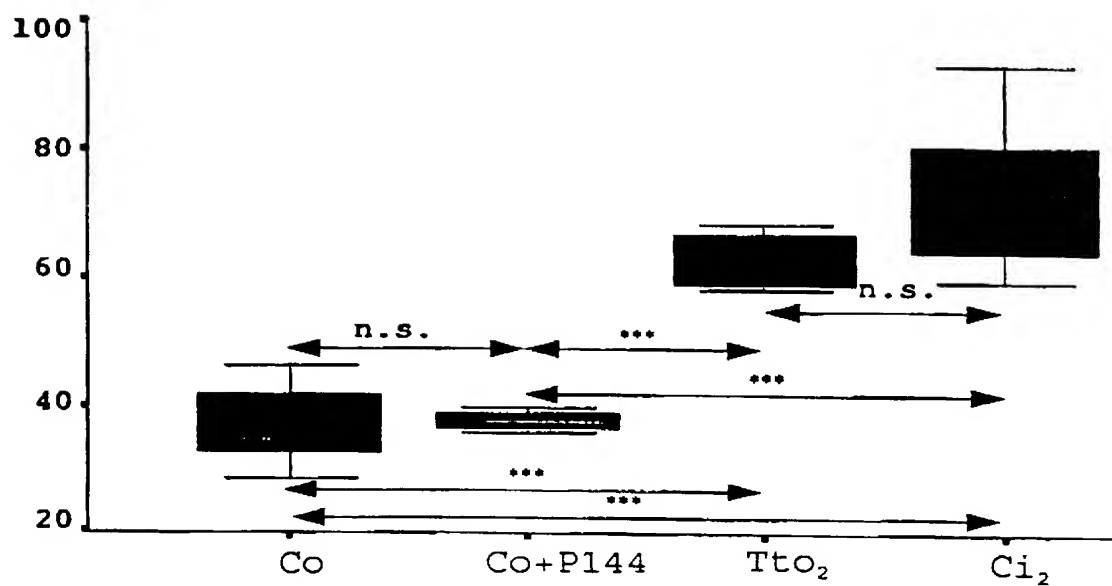


FIGURA 22

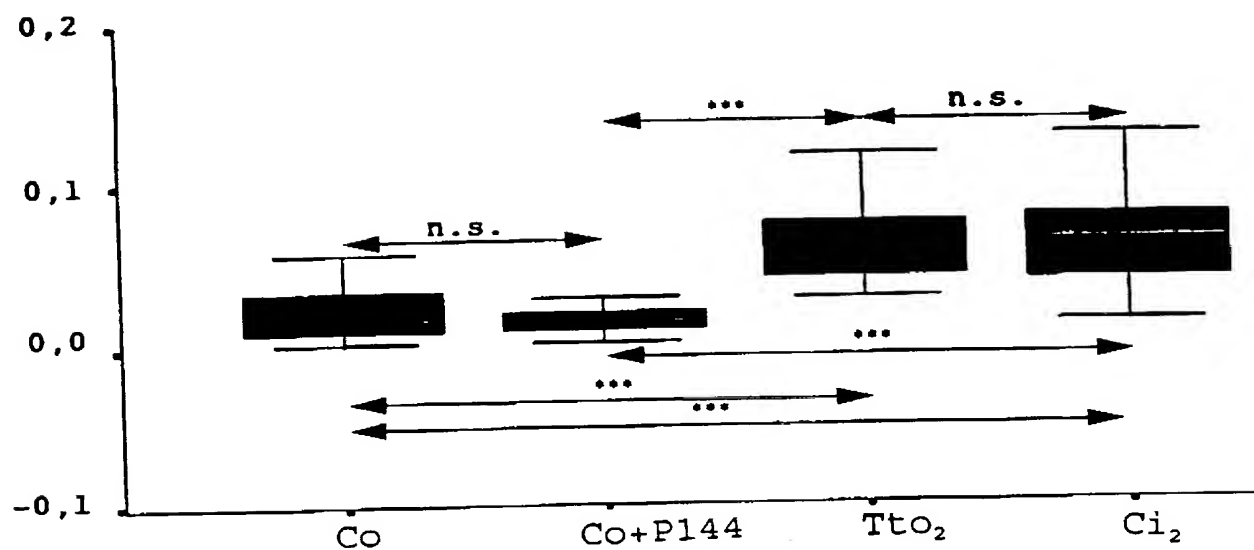


FIGURA 23

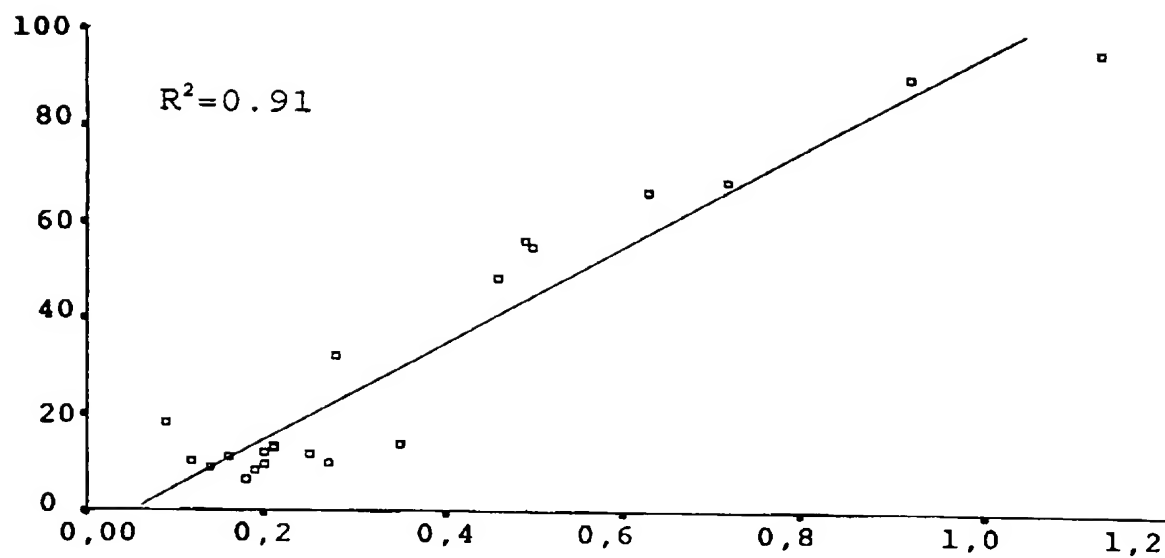


FIGURA 24

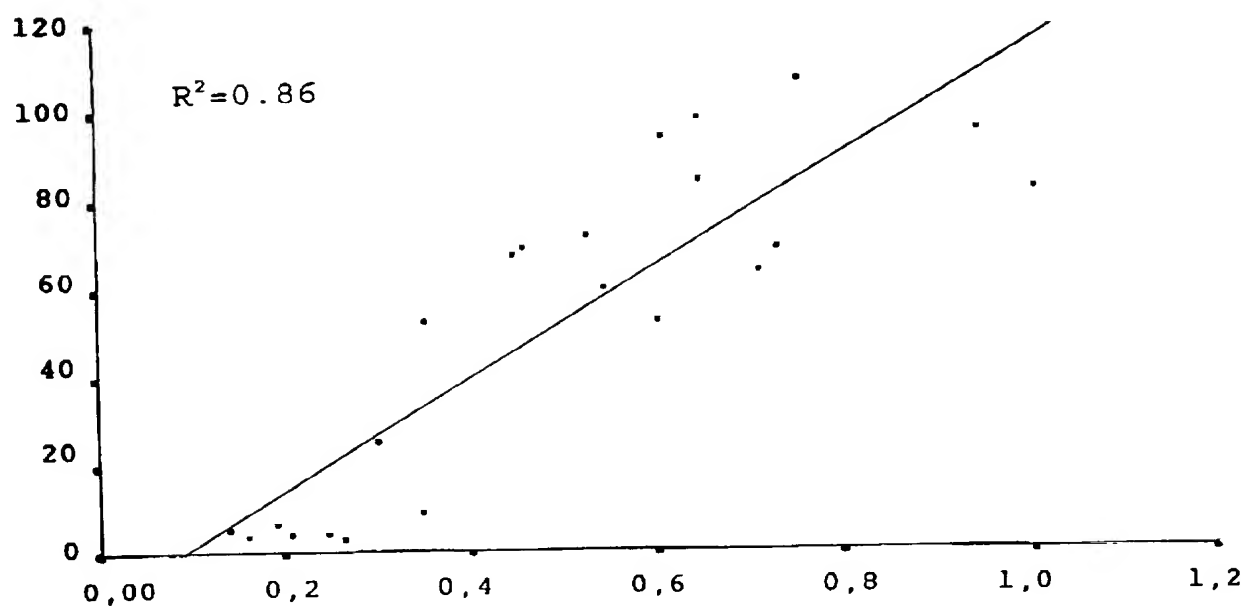


FIGURA 25

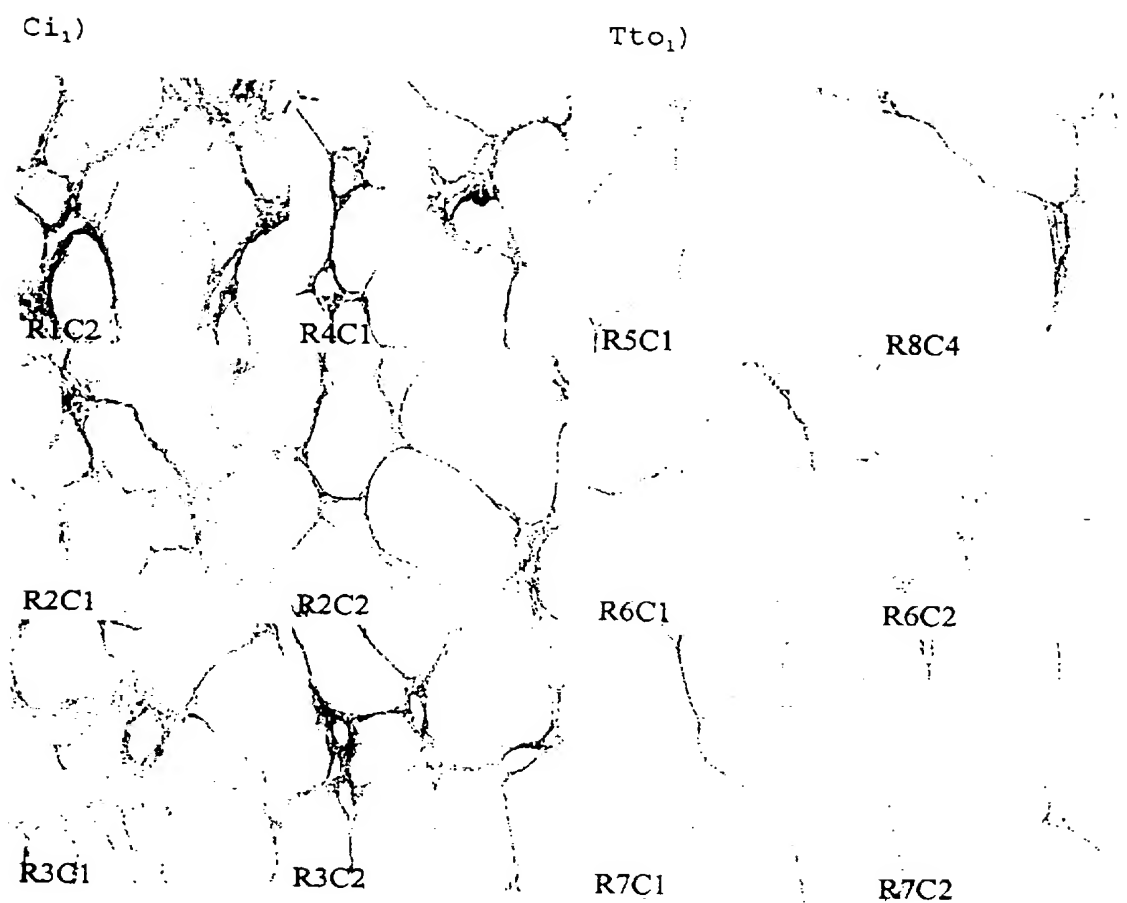


FIGURA 26

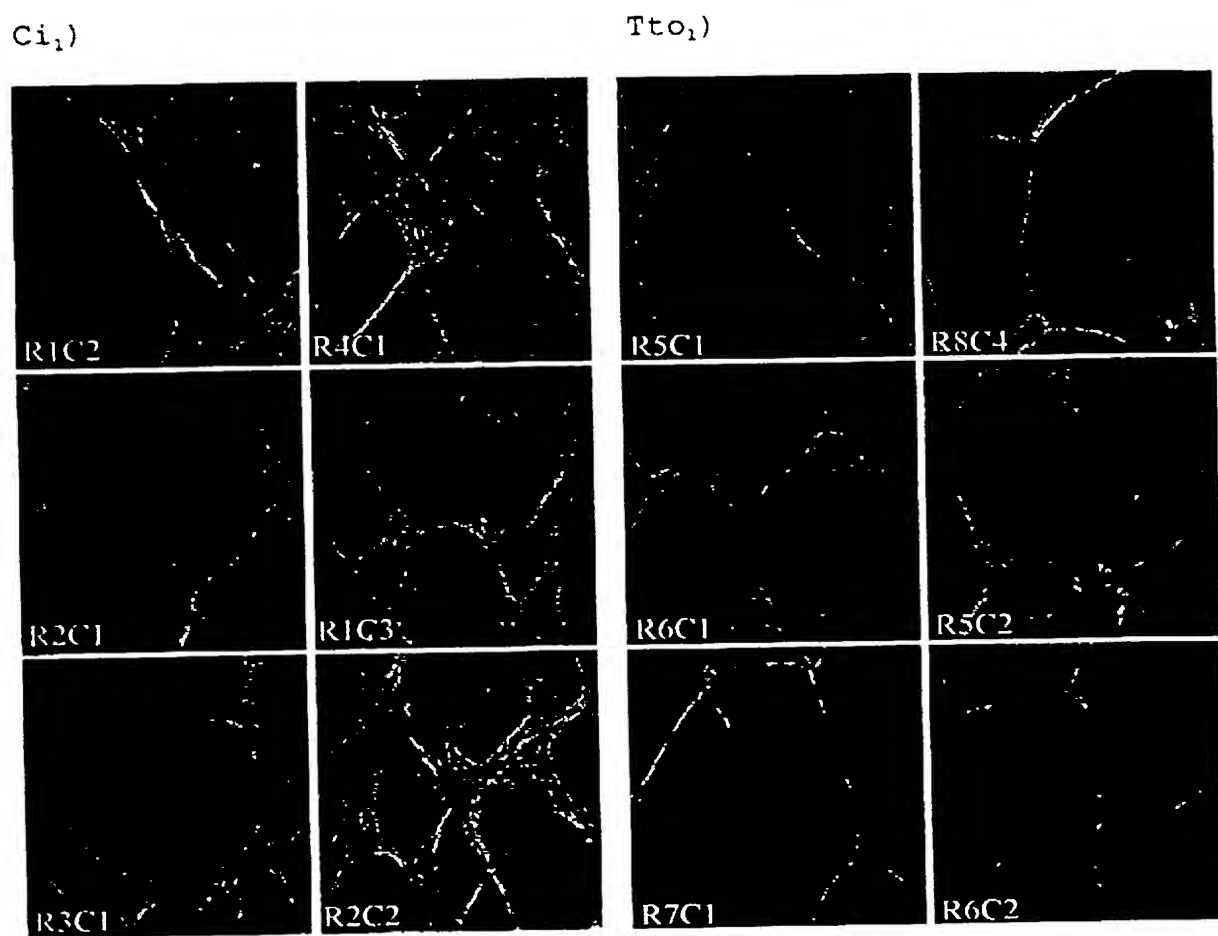


FIGURA 27

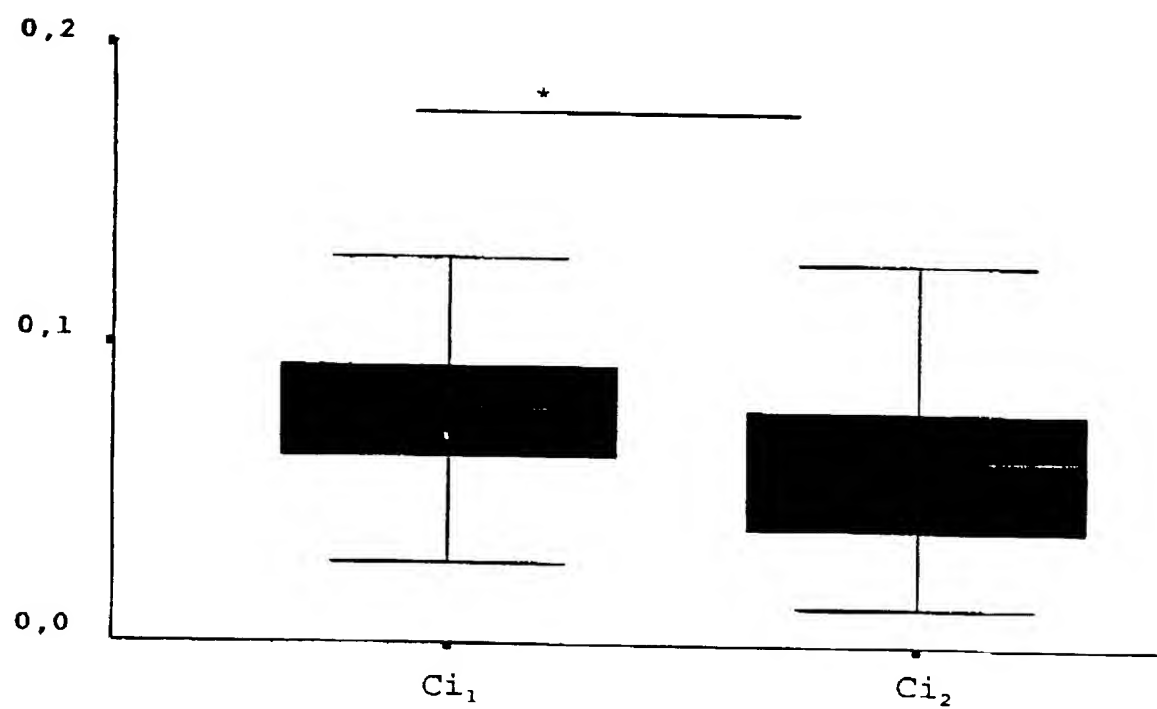


FIGURA 28



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 146 552

⑫ N.º solicitud: 009802465

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 24.11.1998

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl. 7: C07K 14/495, 14/71, A61K 38/18

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FR 2720069 A1 (I.N.S.E.R.M.) 24.11.1995, todo el documento.	1,12-18
X	WO 9625178 A1 (THE UNIVERSITY OF UTAH) 22.08.1996, todo el documento.	1,12-18
X	WO 9220793 A1 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 26.11.1992, todo el documento.	1,12-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

08.03.2000

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1